

Über die Fettsäuren der menschlichen Fettleber

von

Ulrich Troll

aus

Hamburg

1971 № 405



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Über die Fettsäuren der menschlichen Fettleber

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt

von

Ulrich Troll

aus

Hamburg

Als Dissertation genehmigt
von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 6.7. 1971

Dekan:	Professor Dr. W. Jaenicke
Erstberichterstatter	: Professor Dr. G. Hesse
Zweitberichterstatter	: Professor Dr. H. Hofmann

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1966 bis Juni 1970 an der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg.

(Direktor: Professor Dr. Ludwig DEMLING)

Es ist mir ein Bedürfnis, Herrn Professor Dr. Gerhard HESSE, Direktor des Instituts für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg (Lehrstuhl I), an dieser Stelle sehr herzlich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Dissertation zu danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Feinmechanikermeister Erwin HINTERHÖLZEL vom Institut für Angewandte Physik der Universität Erlangen-Nürnberg, der mir beim Bau der Ringspalt-säulen, des Horizontaldestillators und des Ampullenzertrümmerers mit seiner großen Erfahrung stets hilfreich zur Seite stand.

Nicht zuletzt sei der Dank auch Herrn Professor Dr. med. Gerhard BERG, Privatdozent an der Medizinischen Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg ausgesprochen, der diese Arbeit verständnisvoll förderte.

Greift nur hinein ins volle Menschenleben!
Ein jeder lebt's, nicht vielen ist's bekannt,
Und wo ihr's packt, da ist's interessant.

Goethe, Faust I

Meiner lieben Frau in Dankbarkeit zugeeignet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Allgemeiner Teil	4
I. Aufarbeitung der in menschlichem Fettleber- gewebe enthaltenen Glyceride	4
A. Extraktion der Glyceride aus menschlichem Lebergewebe und Überführung in Fettsäure- methylester	4
B. Analysendaten der isolierten Fettsäure- methylester	5
II. Präparative und analytische Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Fett- säuren aus natürlich vorkommenden Fetten	8
A. Allgemeines	8
B. Destillation mit Hilfe von Ringspaltsäulen	9
C. Destillation mit Hilfe von Horizontal- rohren	17
D. Gaschromatographie	20
1. Allgemeines	20
2. Gaschromatographische Analyse mit Hilfe der Ampullenzertrümmerung	21
E. Säulenchromatographische Trennungen unge- sättigter Fettsäuremethylester mit Hilfe von Quecksilber(II)-acetataddukten	27
1. Allgemeines	27
2. Chromatographie der Quecksilberaddukte ungesättigter Fettsäuremethylester	29
F. Bestimmung der Lage der Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren durch oxydative Spaltung	32
G. Spektroskopische Untersuchungen im UV und IR	34

Spezieller Teil	35
I. Isolierung und Identifizierung der im Fett der menschlichen Fettleber enthaltenen Säuren	35
A. Dodeka- und Tetradekasäuren	35
1. n-Dodekan- und n-Tetradekansäure	35
2. Tetradecensäuremethylester	38
a) Gewinnung	38
b) Oxydative Spaltung des Tetradecensäuremethylesters	41
B. Pentadekasäuren	44
C. Hexadekasäuren	44
1. n-Hexadekansäure	44
2. Hexadecensäuremethylester	46
a) Gewinnung	46
b) Oxydative Spaltung des Hexadecensäuremethylesters	47
D. Heptadekasäuren	50
E. Oktadekasäuren	50
1. n-Oktadekansäure	50
2. Oktadecensäuremethylester	52
a) Gewinnung	52
b) Oxydative Spaltung des Oktadecensäuremethylesters	54
3. Oktadekadiensäuremethylester	55
a) Gewinnung	55
b) Oxydative Spaltung des Oktadekadiensäuremethylesters	57
4. Oktadekatriensäuremethylester	59
a) Gewinnung	59
b) Oxydative Spaltung des Oktadekatriensäuremethylesters	64
F. Nonadekasäuren	65

	Seite
G. Eikosasäuren	66
1. Allgemeines	66
2. n-Eikosansäure	66
3. Eikosensäuremethylester	67
a) Gewinnung	67
b) Oxydative Spaltung des Eikosensäuremethylesters	70
4. Eikosadiensäuremethylester	71
a) Gewinnung	71
b) Oxydative Spaltung des Eikosadiensäuremethylesters	73
5. Eikosatriensäuremethylester	75
a) Gewinnung	75
b) Oxydative Spaltung des Eikosatriensäuremethylesters	78
6. Eikosatetraensäuremethylester	80
a) Gewinnung	80
b) Oxydative Spaltung des Eikosatetraensäuremethylesters	82
H. Dokosasäuren	83
1. n-Dokosansäure	83
2. Dokosapentaensäuremethylester	85
3. Dokosahexaensäuremethylester	88
a) Gewinnung	88
b) Oxydative Spaltung des Dokosahexaensäuremethylesters	90
I. Tetrakosasäuren	91
n-Tetrakosansäure	91
J. Zusammenstellung der im Fett der menschlichen Leber (Fettleber) nachgewiesenen Fettsäuren	94
Über das Verhalten stellungsisomerer ungesättigter Fettsäuremethylester bei der Anwendung physikalisch-chemischer Trennverfahren	98
A. Allgemeines	98
B. Gaschromatographie	98
C. Säulenchromatographische Trennungen mit Hilfe von Quecksilberaddukten	101
D. Hochvakuumdestillation	103

	Seite
III. Diskussion der Ergebnisse	104
A. Allgemeines	104
B. Biosynthese und Stoffwechsel der Fettsäuren	109
1. Gesättigte Fettsäuren	109
2. Ungesättigte Fettsäuren	110
 Experimenteller Teil	 117
 I. Extraktion der Glyceride aus dem Gewebe der menschlichen Leber	 117
II. Umesterung der extrahierten Glyceride in die Methylester	117
III. Verseifung	118
IV. Veresterung	119
V. Säurezahl	120
VI. Herstellung der Quecksilber(II)-acetataddukte ungesättigter Fettsäuremethylester	120
VII. Zersetzung der Quecksilberaddukte	121
VIII. Oxydative Spaltung ungesättigter Fettsäureester nach dem Verfahren von E. v. RUDLOFF	122
IX. Jodzahl	123
X. Katalytische Hydrierung	124
XI. Alkaliisomerisierung	125
XII. Herstellung der Trennsäulen für die gaschromatographische Analyse	126

	Seite
Anhang	129
Infrarot- und Ultraviolettpektren der isolierten ungesättigten Fettsäuremethylester	129
I. Allgemeines	130
II. Infrarotspektren	130
III. Ultraviolettpektren	144
Zusammenfassung	150
Literaturverzeichnis	153

EINLEITUNG

Michael Eugène CHEVREUL (1786 - 1889), französischer Chemiker und berühmter Kerzenfabrikant seiner Zeit, gilt heute als Begründer der wissenschaftlichen Fett- und Seifenforschung. Er stellte als erster fest, daß die natürlich vorkommenden Fette des Tier- und Pflanzenreiches aus Glycerin und Fettsäuren bestehen. CHEVREUL isolierte zwischen 1814 und 1823 Buttersäure, Valeriansäure, Capronsäure, sowie Caprinsäure und fand in der Palmitin-, Stearin- und Ölsäure bereits damals schon die Hauptkomponenten fast aller natürlich vorkommenden Fette. Diese Untersuchungen wurden in seiner berühmten Arbeit "Recherches chimique sur les corps gras d'origine animale" (1) im Jahre 1823 veröffentlicht. Erst in der Mitte des gleichen Jahrhunderts wurden Linol- und Linolensäure als weitere wesentliche Bestandteile pflanzlicher und tierischer Fette gefunden.

Wenn auch CHEVREUL durch seine Pionierarbeiten der Fettchemie schon relativ früh erste Impulse gegeben hatte, so dauerte es doch noch fast hundert Jahre, bis tiefere Einblicke in die Zusammensetzung dieser im Tier- und Pflanzenreich so weit verbreiteten Stoffklasse möglich wurden. Das mag wohl im wesentlichen daran gelegen haben, daß keine ausreichenden Methoden zur Auftrennung dieser doch oft recht kompliziert zusammengesetzten Naturstoffe zur Verfügung standen.

Erst als das Verfahren der Destillation auch zur Untersuchung nativer Fette Anwendung gefunden hatte (2), konnten neue Wege für die Fettchemie eröffnet werden. Dennoch waren die damals isolierten Säuren in Form mehr oder weniger stark verunreinigter Präparate angefallen. Erst 1927 gelang es BERTRAM (3) mit Hilfe von Quecksilberacetataddukten zu praktisch reiner Ölsäure zu kommen. Einen entscheidenden

Beitrag zur weiteren Erforschung der Fette leisteten JANTZEN und WIECKHORST im Jahre 1954 (4), als sie mit der Entwicklung hochwirksamer im Vakuum arbeitender Destilliersäulen erstmals eine Auftrennung von Fettsäuremethylestern in Fraktionen einheitlicher Kettenlänge durchführen konnten.

Die Ausarbeitung der chromatographischen Trennverfahren in den vierziger und fünfziger Jahren unseres Jahrhunderts gab dann auch in der Fettchemie den Anstoß zu weiterer und zum Teil recht stürmisch verlaufender Entwicklung.

Nachdem nun exakt arbeitende Methoden der Stofftrennung bereitstanden, begann sich auch das Interesse der Biochemiker in zunehmendem Maße der Erforschung der Stoffwechselwege der Fette des Tier- und Pflanzenreiches zuzuwenden.

So konnte F. LYNEN (5) den Weg von der aktivierten Essigsäure zu den Fettsäuren und damit die biochemisch ablaufende Synthese gesättigter Fettsäuren aufzeigen. An anderer Stelle hatten E. KLENK und W. STOFFEL (6, 7) in langjährigen Untersuchungen entscheidende Ergebnisse zur Kenntnis des Stoffwechsels speziell der Polyenfettsäuren beitragen können.

Wenn auch mit diesen Arbeiten bereits eine Vielzahl tierischer und pflanzlicher Fette Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen war, so bestand doch erhebliches Interesse, diese Untersuchungen mit der Analyse eines menschlichen Organfettes, des Leberfettes, zu vervollständigen. Es schien dies auch insofern wichtig, als die menschliche Leber, zentrales Organ des Aminosäure-, Kohlehydrat- und Fettstoffwechsels, hinsichtlich ihres Fettsäuremusters bisher keiner detaillierten Analyse unterzogen worden war.

So wurde das Ziel der vorliegenden Arbeit dahin gesteckt, eine erste, möglichst umfassende Analyse des menschlichen Leberfettes vorzulegen, um so unsere Kenntnis vom Stoffwechsel der Fettsäuren weiter zu vervollständigen. Dazu mußten unter Verwendung aller modernen zur Verfügung stehenden Trennverfahren möglichst viele der im menschlichen Leberfett vorhandenen Fettsäuren in hoher Reinheit isoliert werden. Hatte man Klarheit über die Struktur der isolierten Säuren erbracht, so bestand die Möglichkeit, die erhaltenen Ergebnisse mit bekannten Resultaten des Tierexperiments zu vergleichen. In der tierischen und pflanzlichen Zelle konnten die Stoffwechselwege ungesättigter Fettsäuren durch Versuche mit Hilfe radioaktiv markierter Säuren weitgehend geklärt werden (7, 8, 9, 10). Um hier beim menschlichen Organfett entsprechende Aussagen über die von den Fettsäuren beim Stoffwechsel eingeschlagenen Wege machen zu können, ist man bislang noch auf den Vergleich mit den Ergebnissen des Tierexperiments angewiesen.

Hoher Lebensstandard unserer Zeit und die damit in Zusammenhang stehende Überernährung führen zu vermehrter Fettablagerung auch in der menschlichen Leber. Dies zeigt die Statistik der Pathologen recht deutlich. So ist die normale, unverfettete Leber heute schon recht selten geworden. Der Fettgehalt einer normalen menschlichen Leber schwankt zwischen 3 und 5 %. Bei der Fettleber kann mit einem Vielfachen dieses Wertes gerechnet werden. Diese Gründe waren ausschlaggebend, die vorliegende Untersuchung an der menschlichen Fettleber durchzuführen.

ALLGEMEINER TEIL

I. Aufarbeitung der in menschlichem Fettlebergewebe enthaltenen Glyceride

A. Extraktion der Glyceride aus menschlichem Lebergewebe und Überführung in Fettsäuremethylester

Als Ausgangsstoffe standen zwei durch Autopsie gewonnene menschliche Fettlebern zur Verfügung. Der histologische Befund ergab folgende Diagnose:

Erste Leber: Stark ausgeprägte, großtropfige, diffuse Leberparenchymverfettung

Zweite " : Mittel- bis grobtropfige, acinozentrale Verfettung.

Danach handelte es sich bei beiden Organen um ausgeprägte Fettlebern. Zur Extraktion der in den Lebern enthaltenen Glyceride wurde das Organgewebe nach kurzem Wässern mechanisch zerkleinert, und der anfallende Gewebebrei in Form einer 20%igen Suspension mit Chloroform/Methanol (Volumenverhältnis 2 : 1) 1 1/2 Stunden am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nachdem man das extrahierte Gewebe durch Filtration entfernt hatte, wurde das Filtrat im Vakuum weitgehendst eingedampft.

Zur Überführung in Fettsäuremethylester erhitzte man die durch Extraktion gewonnenen Glyceride in gleichen Teilen 2%iger methanolischer Salzsäure und Benzol unter Rückfluß 2 Stunden zum Sieden. Nach Abkühlen wurde die schwerere untere Phase, die vorwiegend aus Glycerin und Methanol bestand, entfernt und durch die gleiche Menge frischer methanolischer Salzsäure ersetzt. Zur vollständigen Umesterung kochte man anschließend noch weitere drei Stunden

unter Stickstoff am Rückfluß. Nach Aufarbeitung der benzolischen Phase wurden die gewonnenen Fettsäuremethylester einer Kurzwegdestillation im Zweikugelrohr bei 10^{-3} Torr und Temperaturen zwischen 90 und 140 °C unterworfen. Aus zwei menschlichen Fettlebern mit einem Frischgewicht von zusammen 3300 g standen danach 291 g an Fettsäuremethylestern zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung (nähere Einzelheiten hierzu sind im experimentellen Teil der Arbeit auf Seite 117 angegeben).

B. Analysendaten der isolierten Fettsäuremethylester

Zur Ermittlung der Analysendaten wurden die aus beiden Lebern extrahierten Ester vereinigt und der Bestimmung der wichtigsten Kennzahlen unterworfen:

Dichte d^{20}	0,8721
Brechungsindex n_D^{20}	1,4491
Jodzahl	67,4
Säurezahl	1,54
Gehalt an Transverbindungen	< 1,0 %

Gehalt an Konjuenen

Dien-Konjuen	0,6 %
Trien-Konjuen	0,05%
Tetraen-Konjuen	0,03%

Abbildung 1 zeigt die gaschromatographische Analyse der isolierten Gesamtfettsäuremethylester beider Fettlebern.

Die quantitative Auswertung dieses Chromatogramms ergab für die einzelnen Kettenlängen und Sättigungsgrade folgende Verteilung:

C ₁₄	=	3,0 %
C ₁₆	=	32,9 %
C ₁₆ -Monoen	=	9,1 %
C ₁₈	=	7,2 %
C ₁₈ -Monoen	=	42,7 %
C ₁₈ -Dien	=	5,2 %
C ₁₈ -Trien	=	+ -----
Summe	=	100,1 %

Danach bestand das Gemisch der isolierten Leberfettsäuremethylester zu 43,1 % aus gesättigten Estern. Der Anteil an einfach-ungesättigten Fettsäureestern machte mit 51,8 % mehr als die Hälfte der Gesamtmenge aus. An Polyenfettsäuremethylestern konnten gaschromatographisch dagegen nur 5,2 % ermittelt werden. Unter den gesättigten Verbindungen ist die Palmitinsäure Hauptkomponente. Bei den Monoenen überwiegt die bekannte Ölsäure bei weitem. Polyenfettsäuren sind hiernach praktisch nur durch die essentielle Linolsäure vertreten.

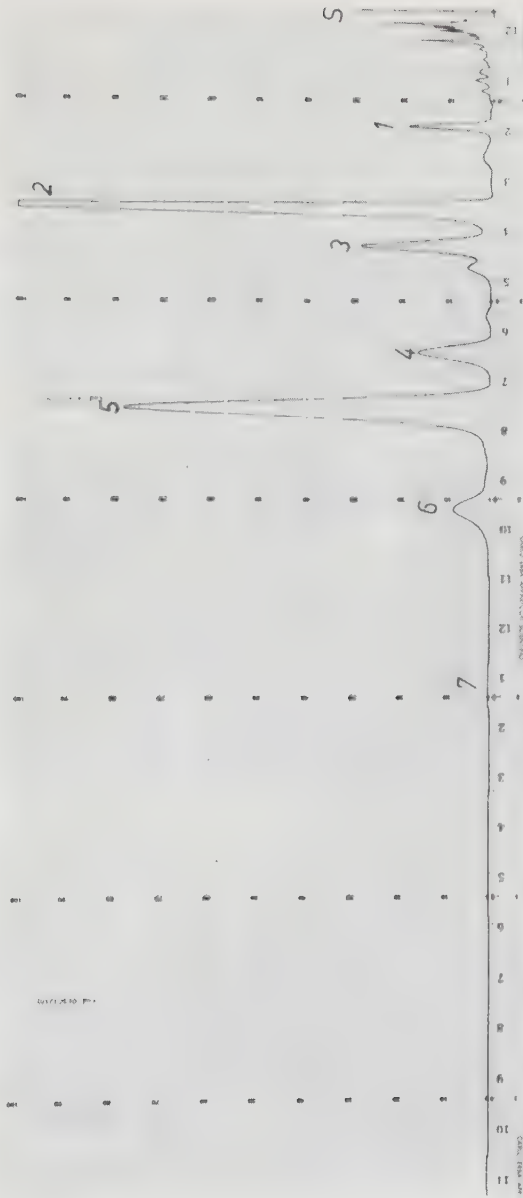


Abb. 1 Gaschromatogramm der Gesamtfettsäuremethylester aus menschlicher Fettleber

(Trennphase = Polydiäthylenglykolsuccinat (20 %) auf Embacel, Länge der Säule 2,5 m, innerer Durchmesser 4 mm, Temperatur 200 °C, Stickstoff-Flußrate 40 ml/min)

1 = C₁₄, 2 = C₁₆, 3 = C₁₆-Monoen, 4 = C₁₈, 5 = C₁₈-Monoen, 6 = C₁₈-Dien,

7 = C₁₈-Trien

II. Präparative und analytische Methoden zur Isolierung und Identifizierung von Fettsäuren aus natürlich vorkommenden Fetten

A. Allgemeines

Seit Einführung der modernen chromatographischen Methoden, die mit geringsten Substanzeinwaagen recht detaillierte Aussagen über die Zusammensetzung auch komplizierter Stoffgemische ermöglichen, ist das Interesse an der Untersuchung der Zusammensetzung natürlich vorkommender Fette in den letzten 20 Jahren fast sprunghaft angestiegen (6, 7).

Die in den zu untersuchenden Fetten enthaltenen Säuren können Ketten mit vier bis vierundzwanzig Kohlenstoffatomen enthalten. Dabei kann es sich um gerad- und ungeradzahlig gesättigte, einfach- und mehrfach-ungesättigte Säuren, sowie mitunter um solche mit Dreifachbindung handeln. Von den ungesättigten Fettsäuren selbst sind zahlreiche Stellungsisomere und auch geometrische Isomere bekannt. Bedenkt man ferner, daß auch die gesättigten Säuren zusätzlich noch in isomeren Formen auftreten können, so wird leicht verständlich, daß zur Trennung und Identifizierung eines natürlichen Säuregemisches das Zusammenspiel vieler verschiedener Analysenverfahren notwendig ist.

Genannt seien hier die klassischen Methoden der Destillation im Vakuum und die der Kristallisation bei tiefer Temperatur. Ferner soll die Trennung über schwerlösliche Salze und Bromverbindungen erwähnt werden. An neueren Methoden kamen hinzu die Verfahren der Verteilung zwischen zwei Lösungsmitteln im Gegenstrom, die der Chromatographie mit Flüssigkeiten in der Säule und auf dem Papier, die der Gas-Flüssigkeitschromatographie, sowie die Trennung mit Hilfe von Harnstoffeinschlußverbindungen.

Die Auftrennung eines Gemisches ungesättigter Fettsäuren in die einzelnen Sättigungsgrade kann heute recht elegant durch säulenchromatographische Trennung gelöst werden. Hierzu werden die aus Quecksilber(II)-acetat und ungesättigten Fettsäuren in methanolischer Lösung entstehenden Addukte an Kieselgel adsorbiert und mit geeigneten Eluenten nach dem Sättigungsgrad wieder von der Säule abgelöst.

Zur Konstitutionsermittlung der isolierten Säuren dienen u. a. die spektroskopischen Untersuchungen im infraroten und ultravioletten Wellenbereich, sowie die oxydative Spaltung an der oder den im Molekül vorhandenen Doppelbindungen, z. B. nach dem Verfahren von E. von RUDLOFF.

Von den oben aufgezählten Methoden zur Isolierung und Identifizierung einzelner Fettsäuren aus nativen Fetten wurden in der vorliegenden Arbeit im wesentlichen die folgenden benutzt:

1. Destillation mit Hilfe von Ringspaltsäulen
2. Destillation im Horizontalrohr
3. Gaschromatographie
4. Trennungen mit Hilfe von Quecksilberaddukten
5. Oxydative Spaltung nach v. RUDLOFF
6. Spektroskopische Untersuchungen im UV und IR.

B. Destillation mit Hilfe von Ringspaltsäulen

Zur Isolierung einzelner Fettsäuren aus natürlich vorkommenden Gemischen bietet sich die Destillation im Vakuum als das zur Stofftrennung klassische Mittel der Wahl an. Aus den im Gemisch vorliegenden Glyceriden müssen zunächst die Fettsäuren gewonnen werden, die als solche zur Destillation eingesetzt werden können. Wegen der Dimerisierungsneigung der freien Säuren arbeitet man jedoch zweckmäßigerweise meist mit den Estern, die durch Umesterung der Glyceride, z. B.

mit methanolischer Salzsäure, leicht zugänglich sind. Durch Überführung in die Methylester lassen sich gleichzeitig die Betriebstemperaturen in der Säule senken, da die Ester im allgemeinen um 20 bis 30 °C niedrigere Siedepunkte als die freien Säuren besitzen. Dies kann wiederum bei der Isolierung der äußerst thermolabilen hochungesättigten Fettsäuren von erheblichem Nutzen sein.

Ein vielteiliges Stoffgemisch wird destillativ im allgemeinen so getrennt, daß man die Hauptkomponenten mit einer passenden Säule aus einer größeren Menge rein abscheidet. Die Zwischenläufe werden dann in einer entsprechend kleineren Kolonne weiter aufdestilliert. Hätte man es bei den durch Umesterung aus nativen Fetten anfallenden Gemischen nur mit gesättigten Estern zu tun, so wäre eine Reindarstellung einzelner Komponenten auf destillativem Wege noch relativ einfach zu verwirklichen. Da in den natürlichen Fetten neben gesättigten Säuren stets aber auch ungesättigte (diese zum Teil in erheblicher Menge) vorliegen, werden die Verhältnisse jedoch bedeutend ungünstiger. Einmal sind die Siedepunktdifferenzen homologer ungesättigter Fettsäuren merklich geringer als die der zugehörigen gesättigten Glieder. Zum anderen handelt es sich bei den ungesättigten Verbindungen um relativ temperaturempfindliche Substanzen, die eine Begrenzung der Arbeitstemperatur erforderlich machen. Um dennoch destillieren zu können, wird man bei stark vermindertem Druck (10^{-3} - 10^{-4} Torr) arbeiten, was wiederum einen Abfall der Trennleistung der Destillationskolonnen zur Folge hat. Eine entsprechende Verlängerung des Kolonnenabschnittes würde aber sofort wieder den Reibungswiderstand und damit auch den Druck in der Säule erhöhen. Man kommt deshalb bei der Dimensionierung der einzelnen Variablen sehr schnell zu einer Grenze, oberhalb der eine weitere Steigerung der Trennleistung nur unter erheblichem Aufwand möglich ist.

Bei der Trennung des aus natürlichen Fetten anfallenden relativ hochsiedenden Gemisches von gesättigten und ungesättig-

ten Fettsäureestern kamen bisher folgende Destillierkolonnen zur Anwendung:

1. Spiralbandsäulen
2. Spiralfedersäulen
3. Drehbandkolonnen
4. Horizontalrohre
5. Ringspaltsäulen

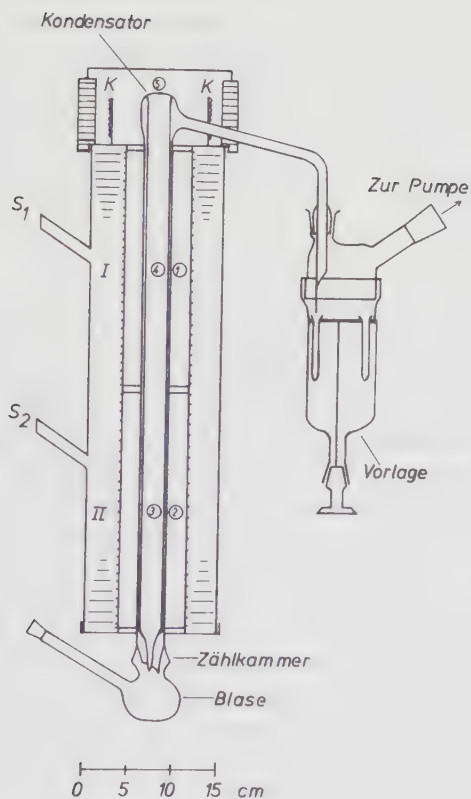
Die Säulentypen 1 - 3 arbeiten mit Einsätzen bis zu 200 g. Im Horizontalrohr (s. S. 17) wird dagegen mit Mengen zwischen 1 und 100 mg Einwaage destilliert. In ihrer Trennleistung bis heute unübertroffen ist die von E. JANTZEN (4) in den 50er Jahren vorgestellte Ringspaltsäule für Einsätze bis zu 40 g. In etwas abgewandelter Form wurde dieser Säulentyp auch für größere Einsätze (bis zu 400 g) und sehr kleine Mengen (1 - 5 g) zugänglich gemacht. Anstelle des Ringspaltes verwendet man dann gerade, ungefüllte Rohre.

In der vorliegenden Arbeit sollte die destillative Auftrennung der aus menschlichem Leberfett isolierten Fettsäureester mit Hilfe einer solchen hochwirksamen Ringspaltsäule durchgeführt werden. Da handelsübliche Spaltsäulen mit einem relativ hohen Preis belastet sind, war mir die Aufgabe gestellt, eine solche Säule für Einsätze bis zu 40 g zu bauen. Der Typ der Ringspaltsäule wird im Detail von JANTZEN und WIECKHORST (4) beschrieben. Hier sollen deshalb nur die wesentlichen Merkmale dieser Destilliersäule vorgestellt werden:

Kernstück der 50 cm langen Kolonne ist ein ringförmiger Spalt von 2,5 mm Breite, der zwischen zwei konzentrischen, an geeigneten Stellen miteinander verschmolzenen Glasröhren gebildet wird. Das wichtigste Kennzeichen dieses Ringspaltes sind ca. 0,2 mm tiefe, spiralförmige Nuten, die in beide für den Stoffaustausch zur Verfügung stehende Wandflächen eingeätzt sind. Dadurch wird eine sehr gleichmäßige

Filmbildung auf beiden Rohroberflächen erzielt. Der Rücklauf fließt mit einer langsamen Drehbewegung abwärts. Unten an das Kolonnenrohr ist zunächst die Zählkammer und anschließend die Destillierblase (maximales Fassungsvermögen 40 g) mit seitlichem Einfüllstutzen angeschmolzen. Oben schließt sich ein erweitertes Rohrstück als Dephlegmator an die Kolonne an. An diesem Dephlegmator sitzt seitlich das Abtropfrohr, über welches das Destillat schließlich in die Wechsellvorlage gelangt.

Bei einer wirksamen Fraktionierung muß die Trennsäule nach Möglichkeit adiabatisch, d. h., ohne Wärmeverlust und ohne Wärmezufuhr von außen arbeiten. Ein guter Wärmeschutz ist deshalb Voraussetzung für eine hohe Trennleistung. Als Isoliermaterial wurde hier Korkschröt benutzt, und der gesamte freie Raum zwischen dem Glaskörper der Säule und der Außenwand des Kolonnenkörpers mit diesem Material ausgefüllt. Als Außenwand des Kolonnenkörpers diente ein Zylinder aus 1 mm starkem Messing mit einem Durchmesser von 15 cm. Seitlich sind an den Zylinder die Stutzen S_1 und S_2 angelötet. Durch diese werden die beiden Kontaktthermometer an die Heizabschnitte geführt. Oben und unten ist die Kolonne mit Deckeln aus Eisenblech verschlossen. Abbildung 2 zeigt die Ringspaltsäule im Schnitt.



● = Thermoelemente

Abbildung 2
Ringspaltskule im Schnitt

Der Kondensator am Kopf der Säule dient zur Erzeugung des für den Stoffaustausch notwendigen Rücklaufs. Die Kühlung erfolgt durch die umgebende Luft. Um bei höhersiedenden Substanzen überhaupt Produkt entnehmen zu können, ist um den Kondensator ein mit maximal 20 Watt zu betreibender Heizring K angeordnet. Heizring und Kondensator befinden sich dabei in einer aus einem Korkring und einem Uhrglas gebildeten Haube. Die Temperatur der unter dieser Haube befindlichen Luft kann mit Hilfe des Thermoelementes 5 gemessen werden.

Hochwirksame Destilliersäulen, wie sie Ringspaltsäulen darstellen, bedürfen zu ihrem Betrieb einer speziellen Beheizung. Es empfiehlt sich, für die Destillierblase und den Kolonnenkörper je einen getrennten Heiz- und Regelkreis ausulegen. Da längs einer Destilliersäule immer ein Temperaturgefälle besteht, ist es zur Durchführung präziser Trennungen zweckmäßig, auch noch den Heizmantel des Kolonnenkörpers in einen oberen und einen unteren Heizabschnitt zu unterteilen und beide, ebenfalls unabhängig voneinander, zu regeln. Damit sind für die gesamte Anlage drei separate Heiz- und Regelkreise ($R_1 - R_3$) notwendig. Zur Beheizung der Destillierblase dient ein Topf, der mit hochsiedendem Silikonöl gefüllt ist. Dieser Topf ist gleichzeitig mit einem Heizmantel (Kaltwiderstand 500Ω) ausgekleidet. Zur Erzielung konstanter Temperaturen in der Destillierblase ist es erforderlich, das Öl im Heiztopf während der Destillation ständig mit einem kleinen, von einem Elektromotor angetriebenen Rührer gut zu durchmischen.

Die Temperatur des Heizwiderstandes im Ölbad wird mit einem Kontaktthermometer K_1 und einer Relaisanordnung unter Zuhilfenahme eines Thyratrons nach der Temperatur des Ölbadest gesteuert. Zur Beheizung des Kolonnenkörpers wird das Trennrohr im Abstand von 3 cm von einem zylindrischen Mantel aus 0,5 mm starkem Messingblech umgeben, der durch Ausschnitte in der Mitte in zwei gleichlange Teile gegliedert ist. Nur schmale Stege verbinden beide Teile miteinander. Dadurch

wird der Wärmeübergang zwischen beiden Heizabschnitten sehr gut zurückgehalten. Außen ist dieser Messingzylinder oben und unten mit je einem Heizmantel (Kaltwiderstand 500Ω) umschlossen. Die Temperaturen beider Heizmäntel werden in gleicher Weise wie beim Ölbad mit Hilfe zweier Kontaktthermometer (K_2 und K_3) und der entsprechenden Relaisanordnungen nach der Temperatur des Kolonnenkörpers gesteuert. Im einzelnen vollzieht sich die Beheizung der Gesamtanlage wie folgt:

Der Strom zur Beheizung aller drei Abschnitte wird von Hand mit Drehwiderständen grob eingestellt. Ist die an den Kontaktthermometern eingestellte Temperatur erreicht, so wird über die Relais der drei Regelautomaten jedem Heizkreis ein veränderlicher Widerstand zugeschaltet, so daß nun ein entsprechend geringerer Strom die Heizwicklung durchfließt. Sinkt die Temperatur am Kontaktthermometer dagegen ab, so wird dieser regulierbare Zusatzwiderstand über die Relais in der nun folgenden Aufheizphase kurzgeschlossen und damit wieder ein höherer Strom dem Heizmantel zugeführt.

Die Temperaturen im Ölbad und in der Säule können mit dieser Anordnung auf $\pm 0,4^\circ\text{C}$ genau über den Bereich von $70 - 180^\circ\text{C}$ eingestellt werden. Die Temperaturmessung erfolgt mit Hilfe von fünf Thermoelementen, von denen eines im Ölbad und vier in der Kolonne untergebracht sind. Als Material wird zweckmäßigerweise Eisen-Konstantan gewählt. Von den vier Thermoelementen in der Säule sind jeweils zwei in gleicher Höhe an der Innen- und Außenwand des Glaskörpers in Höhe der Mitte beider Heizabschnitte befestigt. Als Vergleichsstelle dient ein Thermoelement in schmelzendem Eis. Die entstehenden Thermospannungen werden mit einem Multiflex-Spiegelgalvanometer gemessen (Firma Bruno Lange, Berlin). Einen schematischen Überblick über die Gesamtanlage gibt Abbildung 3.

Das Destillat gelangt schließlich über das Abtropfrohr in die für Vakuumbetrieb ausgelegte Wechsellvorlage. In dieser Vorlage können maximal 10 Auffanggläser untergebracht werden. Wenn diese Gläser mit Destillat gefüllt sind, muß die Destillation unterbrochen werden. Man ersetzt durch neue, leere Gläser und heizt von neuem auf. In sechs Hauptdestillationen wurden in dieser Spaltsäule insgesamt 240 g Gesamtfettsäuremethylester in Portionen zu 40 g aufdestilliert. Die Säule besitzt bei einer Destillatabnahme von 1 Tropfen pro Minute und einem Rücklaufverhältnis von etwa 50 : 1 eine Trennwirksamkeit, die ca. 50 theoretischen Böden entspricht.

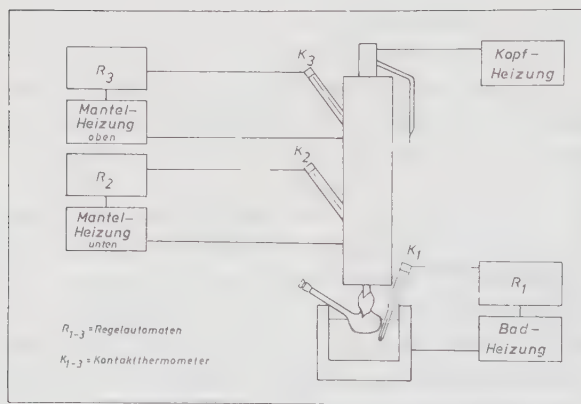


Abbildung 3

Schematische Ansicht der Gesamtanlage

Nach jeder Hauptdestillation kocht man die Säule mit Benzol aus, gewinnt daraus den Haftinhalt der Kolonne und vereinigt diesen mit dem jeweiligen Blasenrückstand.

Auf diesem Wege konnte das erste Ziel der Arbeit, das in einer destillativen Auftrennung der Gesamtfettsäuremethylester in Fraktionen einheitlicher Kettenlänge bestand, weitgehend erreicht werden. Nur in einigen Zwischenfraktionen waren noch Nachbarkettenlängen enthalten. Eine destillative Entfernung dieser Verunreinigungen ließ sich in der großen Säule wegen zu geringer Substanzmengen (es standen Fraktionen von etwa 1 bis 5 g zur Destillation an) nicht gut durchführen. So wurde noch eine zweite, kleinere Säule erstellt, die als "Mikrosäule" für Substanzeinsätze von 1 bis 5 g ausgelegt wurde. Eine genaue Beschreibung dieser neuen Säule wurde von B. KUCHENBUCH (11) vorgelegt. Wesentliches Merkmal dieser Mikrosäule war, daß die Trennung jetzt nicht mehr am Ringspalt, sondern im leeren Rohr erfolgte. Die Dimensionen der Kuchenbuchschen Säule wurden dabei im wesentlichen übernommen. Es soll jedoch noch erwähnt werden, daß auf die äußerst aufwendige Regelautomatik von KUCHENBUCH verzichtet werden konnte. Dafür konnte mit gutem Erfolg auf die beim Bau der großen Ringspaltsäule verwendeten einfacheren elektronischen Regelelemente (mit geringfügiger Abänderung) zurückgegriffen werden.

Unter Verwendung der großen Spaltsäule und der Mikrosäule konnten schließlich sämtliche in der vorliegenden Arbeit angefallenen Destillationsprobleme zufriedenstellend gelöst werden.

C. Destillation mit Hilfe von Horizontalrohren

Stehen Stoffgemische in der Größenordnung von mehreren 10 g zur Trennung an, so wird man in der Regel die Isolierung einzelner Komponenten auf destillativem Wege mit Hilfe mittelgroßer Ringspaltsäulen beginnen. Bei geringeren Substanzmengen (1 - 5 g) können dann unter Umständen Mikrosäulen mit Erfolg eingesetzt werden. Bei noch kleineren Stoffmengen versagen diese Verfahren jedoch alle sehr schnell,

da für den erforderlichen kontinuierlichen Rücklauf nicht mehr genügend Substanz zur Verfügung steht. Andererseits ist das Verhältnis zwischen den durch die große Oberfläche bedingten Wärmeverlusten und den auszutauschenden Wärmemengen beider Phasen so groß, daß eine adiabatische Versuchsdurchführung nicht mehr zu erreichen ist.

Für Stoffmengen von 1 bis 100 mg entwickelten deshalb E. JANTZEN, H. WITGERT und G. LIST (12, 13) ein Verfahren der Mikrodestillation mit Hilfe horizontal liegender Rohre. Dieses Trennverfahren ist durch geringen apparativen Aufbau, betriebliche Einfachheit und durch eine fast beliebig weit zu treibende Trennschärfe gekennzeichnet.

Auch bei diesem waagrecht angeordneten Verfahren der multiplikativen Verteilung müssen Dampf und Flüssigkeit im Gegenstrom in innigen Kontakt miteinander gebracht werden. Anders als bei den senkrecht stehenden Kolonnen streicht hier der Dampf über einen geringen Flüssigkeitsbeschlag auf der Innenwand des waagrecht liegenden Rohres. Führt man die Wand der Austauschvorrichtung jeweils wieder nach dem Verdampfungspunkt zurück, so sind zum innigen Stoffaustausch beim Horizontaldestillator nur geringste Substanzmengen notwendig. Von außen gibt man der Austauschvorrichtung ein passendes Wärmegefälle, damit der Dampf keine Erwärmungsarbeit leisten muß. Um eine Rückdiffusion der erzeugten Dämpfe zu vermeiden, verwendet man einmal enge Glasrohre, bzw. Kapillarrohre, zum anderen benutzt man ein Trägergas geringen Molekulargewichtes, das in Richtung des Wärmegefälles strömt.

Wichtigster Teil des Horizontaldestillators ist ein auf einem Schlitten verschiebbarer Zylinder aus Aluminium. Dieser Zylinder ist ca. 200 mm lang, hat einen Durchmesser von 40 mm und besitzt eine zentrale Bohrung von 6 mm. An der linken Seite des Aluminiumblocks sind zwei Mikrogasbrenner angeordnet. Um das rechte Ende ist eine Kühlschlange aus Kupferrohr gewickelt. Damit läßt sich das erforderliche

Wärmegefälle im Block gut einstellen und regulieren. An beiden Enden des Zylinders befinden sich Bohrungen für Thermometer und zur Beobachtung des Destillationsverlaufes. Eine kleine Flammenschürze am linken Ende des Zylinders verhindert eine Erwärmung bereits ausdestillierter und schon abgetrennter Substanzzonen. Durch die zentrale Bohrung des Aluminiumblocks wird schließlich ein Glasrohr (lichte Weite 4 mm) von 120 cm Länge geschoben und an beiden Enden von zwei Klemmen gehalten.

Zum Betrieb wird das Substanzgemisch in das linke Ende des Glasrohres eingefüllt. Man evakuiert und stellt mit Hilfe eines Feinregulierventiles den nötigen Trägergasstrom ein. Hierzu wird meist Wasserstoff benutzt. Das linke Ende des Aluminiumblocks wird nun über die Substanz geschoben. Dann heizt man langsam auf, bis der Substanztropfen zu destillieren beginnt. Im Block soll dabei ein Wärmegefälle von etwa 30 °C vorhanden sein. Die leichter siedenden Anteile wandern nun weiter als die schwerer siedenden und werden in den kälteren Teilen des Blocks niedergeschlagen. Wenn der ganze Tropfen verdampft ist, schiebt man den Schlitten einige Zentimeter weiter nach rechts und heizt von neuem auf. Diesen Vorgang wiederholt man mehrfach, bis das Schwerersiedende weitgehend ausdestilliert ist. Schließlich läßt man diese Anteile ganz zurück, indem man die beheizte Zone schnell über sie hinwegschiebt. Man fährt in gleicher Weise fort, bis das andere Ende des Glasrohres erreicht ist. Hier angekommen, bricht man die Destillation ab. Auf diese Weise läßt sich das Substanzgemisch in eine Vielzahl voneinander getrennter Zonen aufteilen. Zur Kontrolle des Destillationsverlaufes schiebt man das Glasrohr durch einen geeigneten Schmelzpunktsapparat und bestimmt die Fließpunkte sämtlicher Zonen. Durch Auseinanderschneiden des Rohres sind die Zonen reiner Substanzen leicht zugänglich. Ist im ersten Destillationsgang keine vollständige Trennung erzielt worden, dann wiederholt man den Vorgang mit entsprechenden Kernfraktionen ein- oder zweimal, oder man arbeitet in einer entsprechend kleiner dimensionierten Apparatur mit

Kapillarrohren. Je langsamer man den Wagen über das Glasrohr schiebt, desto weiter läßt sich die Auftrennung eines Gemisches in die einzelnen Bestandteile vorantreiben. Das Verfahren ist besonders auf solche Stoffe anwendbar, die bei Zimmertemperatur fest sind und zur Tröpfchenbildung neigen, d. h., bei der Destillation günstige Randwinkel zum Glas hin ausbilden. Polare Stoffe wie Fettsäuren und Amine lassen sich sehr gut destillieren. Unpolare Verbindungen, wie Kohlenwasserstoffe, neigen dagegen zum Kriechen auf der Glaswand. Für sie ist das Verfahren deshalb ungeeignet. In dieser Arbeit wurde die Destillation im Horizontalrohr zur Reindarstellung gesättigter Fettsäuren herangezogen. Für ungesättigte Fettsäuren ergeben sich wegen der niedrigen Schmelzpunkte dieser Verbindungen besondere Probleme.

D. Gaschromatographie

1. Allgemeines

Unter gaschromatographischer Analyse versteht man ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem das zu untersuchende Substanzgemisch zwischen einer flüssigen stationären und einer gasförmigen mobilen Phase verteilt wird. Die Gaschromatographie ist anwendbar auf alle unzersetzt und rückstandsfrei verdampfenden flüssigen oder festen Stoffe. Seit den grundlegenden Veröffentlichungen von MARTIN und JAMES im Jahre 1952 hat dieses Analysenverfahren eine unerhört schnelle Entwicklung durchgemacht. Es darf heute mit Recht als Spezialgebiet der chromatographischen Trennverfahren bezeichnet werden. Hatten MARTIN und JAMES anfangs noch mit den freien Fettsäuren gearbeitet, so hat es sich doch heute durchweg eingebürgert, die Fettsäuren in Form ihrer Methylester der Analyse zu unterwerfen. Die Gründe hierfür sind folgende: die Methylester siedend um etwa 20 bis 30 °C tiefer als die freien Säuren und werden daneben viel weniger stark durch die Adsorptionskräfte des Trägermaterials be-

einflußt. Besonders diese Adsorption verringert aber die Flüchtigkeit der freien Säuren in der gaschromatographischen Säule enorm und führt zu asymmetrischen Banden, die in langen Schwänzen (tailing) auslaufen. Außerdem umgeht man durch Veresterung die Dimerisationsneigung der freien Fettsäuren.

In dieser Arbeit wurde die gaschromatographische Analyse zur Verfolgung des Trennungsganges während der Destillation und der Säulenchromatographie der Quecksilberacetataddukte eingesetzt. Sie diente ferner als unentbehrliches Hilfsmittel bei der Identifizierung der durch Oxydation ungesättigter Fettsäuren entstandenen Spaltprodukte, sowie zur Reinheitskontrolle der aus dem Leberfett isolierten Säuren.

2. Gaschromatographische Analyse mit Hilfe der Ampullenzertrümmerung

Aufbau und Arbeitsweise gaschromatographischer Analysengeräte sind in der Literatur hinreichend beschrieben. Hier soll dennoch kurz das Strömungsschema des benutzten Gaschromatographen erläutert werden, weil der allgemein übliche Weg der Substanzaufnahme mit Hilfe von Mikroliterspritzen bei der Durchführung der vorliegenden Untersuchung keine zufriedenstellenden Ergebnisse brachte und in zahlreichen Fällen sogar versagte. Es wurde deshalb dieser meist beschrittene Weg der Substanzaufnahme verlassen und durch die weniger geübte Methode der Ampullenzertrümmerung ersetzt. Dazu mußte allerdings das Strömungsschema des Gaschromatographen abgeändert werden. Das Prinzip der Gas-Flüssigkeitsverteilung ist aus der schematischen Abbildung 4 zu ersehen:

Aus einer Stahlflasche wird über einen Doppeldruckminderer nachgereinigter Stickstoff als Trägergas entnommen. Gewöhnlicher Stickstoff ist wegen der Empfindlichkeit der stationären Phasen gegenüber Sauerstoff ungeeignet. Der Druck des

Trärgases ist am Feinmanometer M einstellbar. Von hier gelangt der Stickstoff direkt in die Verdampfungskammer V, wo er die zur Analyse aufgegebene Substanz mitnimmt und auf die Trennsäule S befördert. Die Trennsäule befindet sich in einem Thermostatenraum T, der konstant auf die gewünschte Arbeitstemperatur eingestellt werden kann. Auf der Säule

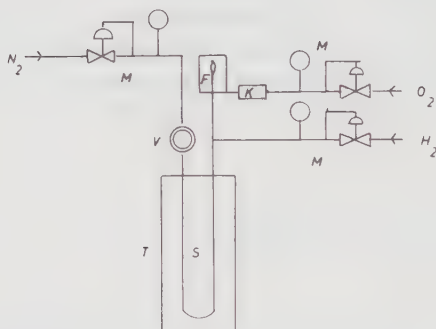


Abbildung 4
Strömungsschema eines Gaschromatographen

findet eine Verteilung der einzelnen Komponenten des Stoffgemisches zwischen einer flüssigen stationären Phase und dem Trärgasstrom statt. Aufgrund unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten werden die einzelnen Substanzen verschieden schnell durch die Trennsäule wandern und treten im Idealfall als vollständig getrennte Fraktionen am Säulenende aus. Von hier gelangen sie bei Verwendung eines Flammenionisationsdetektors durch die beheizte Brenndüse in eine kleine Flamme F. Diese wird durch einen Wasserstoffstrom erzeugt, der über einen Doppeldruckminderer aus einer zweiten Stahlflasche entnommen wird. In einer kleinen Kammer mischt sich der Wasserstoff mit dem Trärgas. Zur Aufrechterhaltung der Wasserstoffflamme wird über ein Kohlefilter K gereinigte Luft der

Zelle zugeführt. In dieser Flamme verbrennen die aus der Trennsäule austretenden organischen Substanzen. Sie erzeugen in einem elektrischen Feld zwischen zwei Elektroden, die um die Flamme angeordnet sind, Ionenströme, die nach entsprechender Verstärkung mit Hilfe elektronischer Kompensationsschreiber in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet werden können.

Das Einbringen der zu untersuchenden Substanzen wird üblicherweise mit Hilfe sogenannter Mikroliterspritzen vorgenommen. Die Probe wird in die Spritze eingesogen und nach Durchstoßen einer Silikongummimembrane am Verdampfer dem Trägergasstrom beigegeben. Solange flüssige Substanzen und diese in genügend großer Menge zur Verfügung stehen, ist das Einspritzen der Stoffe die einfachste und schnellste Methode der Substanzaufnahme.

Zur Bestimmung der Lage der Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren werden die isolierten Säuren an der oder den im Molekül vorhandenen Doppelbindungen oxydativ aufgespalten. Hierbei entstehen Mono- und Dicarbonsäuren, die gaschromatographisch analysiert werden sollten. Da für die oxydative Spaltung zum Teil nur äußerst geringe Mengen verfügbar waren, ergaben sich beim Aufziehen der anfallenden Spaltester in handelsübliche Mikroliterspritzen erhebliche Schwierigkeiten. Das wird verständlich, wenn man bedenkt, daß nach Aufarbeitung dieser Spaltsäuren mit anschließender Veresterung und Entfernung des bei der gaschromatographischen Analyse störenden Lösungsmittels diese geringen Spaltprodukte die Gefäßwand des Kolbens nur noch in Form eines dünnen Filmes überziehen. Eine Dosierung mit Lösungsmittel war nicht möglich, da speziell bei der Analyse der niedrigsiedenden kurzkettigen Spaltester Überlagerungen mit Lösungsmittelpeaks die Folge gewesen wären. Um die Proben dennoch quantitativ in den Gaschromatographen überführen zu können, mußte die Einspritzmethode verlassen und ein anderer Weg beschritten werden:

Nach Veresterung der Spaltsäuren dampft man die Reaktionsprodukte zusammen mit dem Lösungsmittel bis auf etwa 1 ml ein und überführt anschließend alles in kleine Glasampullen. Jetzt wird das gesamte Lösungsmittel verdampft, die Ampulle abgeschmolzen und in einen beheizbaren Verdampfungsblock gegeben. Hier wird sie mit Hilfe eines Metallstößels, der sich im Einspeisblock befindet und durch eine Stopfbuchse aus Teflon gedichtet ist, zerstoßen. Der Zertrümmerer^{*)} wurde für diese speziellen Zwecke nach eigenen Angaben angefertigt und ist in den Abbildungen 5 und 6 in zerlegtem Zustand und komplett zusammengesetzt mit dem Verdampfungsblock wiedergegeben.

Abbildung 5
Ampullenzer-
trümmerer
(zerlegt)

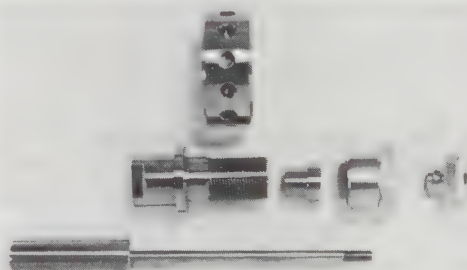
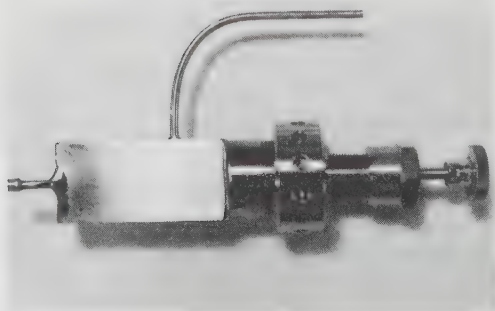


Abbildung 6
Ampullenzer-
trümmerer
(komplett mit
Verdampfungs-
block)



*) Als Material wurde Chrom-Nickel-Stahl verwendet.

Während des Eingebens der Ampullen gelangt Luft in den Einspeisblock. Sie darf nicht auf die Trennsäule kommen, weil sie dort die stationäre Phase schädigen würde. Es muß deshalb das Strömungssystem für das Trägergas unterbrochen und eine Rückspülleitung eingebaut werden, die aus dem Strömungsschema der Abbildung 7 ersichtlich ist. Mit dieser Rückspülleitung ist es möglich, die eingedrungene Luft nach Öffnen des Nadelventils NV über den Dreiwegehahn H herauszuspülen. Die in den auf ca. 260 °C erwärmten Zertrümmerer eingelegte Ampulle wird dann zerstoben, die Substanz verdampft augenblicklich und gelangt auf die Trennsäule.

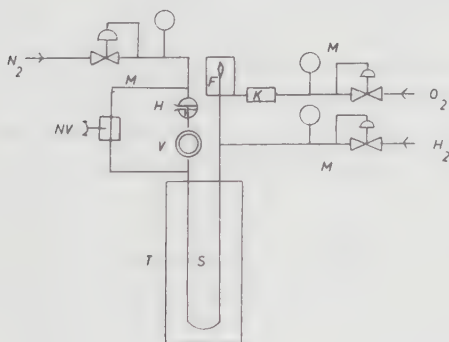


Abbildung 7

Strömungsschema des Gaschromatographen
mit Rückspülleitung, Nadelventil und
Dreiwegehahn

Die Methode der Ampullenzertrümmerung wurde in der Fachliteratur (14, 15, 60) mehrfach beschrieben. Da die Industrie bis heute jedoch keine diesbezüglich modifizierten Geräte angeboten hat, wird diese Methode der Substanzaufgabe wohl auch weiterhin dem Eigenbau vorbehalten bleiben. Das Verfahren ist zwar etwas zeitraubender als die Einspritzmethode, es erlaubt jedoch Bruchteile eines Milli-

gramms verlustlos und frei von Lösungsmitteln zu analysieren. Ferner lassen sich auf diese Weise ganze Analysenreihen vorbereiten und zu einem späteren Zeitpunkt einsetzen.

Sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten gaschromatographischen Analysen wurden mit der Methode der Ampullenzertrümmerung eingeleitet. Als Gaschromatograph wurde das Modell Fractovap C der Firma Carlo Erba, Mailand, mit Flammenionisationsdetektor benutzt. Es wurde nachträglich mit Ampullenzertrümmerer, Rückspülleitung, Nadelventil und Dreiwegehahn bestückt.

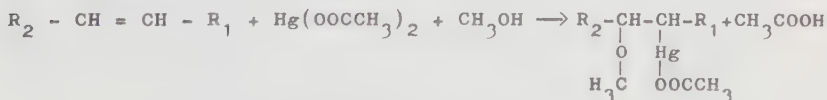
Für polare Trennsäulen verwendete man Polydiäthylenglykolsuccinat, für unpolare ein spezielles Weißöl (Ondina) der Firma Deutsche Shell. Als Trägermaterial konnte Embacel ausgesiebter Korngröße mit Erfolg benutzt werden. Für die polaren Trennsäulen wurde eine 20%ige Imprägnierung des Trägers gewählt. Für die unpolaren Säulen schien eine geringere, 15%ige Belegung vorteilhafter. Die Länge der Trennsäulen betrug 2,5 m. Als Material wurde Cu-Rohr mit einer lichten Weite von 4 mm benutzt. Als Trägergas diente nachgereinigter Stickstoff mit einer Flußrate von 40 ml/min. Die polaren Trennsäulen wurden bei einer Arbeitstemperatur von 200 °C betrieben. Nur bei der Analyse der Spaltester mußte die Temperatur auf 150 °C gesenkt werden. Auf der Mineralölsäule wurde ausschließlich bei 150 °C chromatographiert. Zur Herstellung der Trennsäulen siehe Seite 126.

E. Säulenchromatographische Trennungen ungesättigter Fettsäuremethylester mit Hilfe von Quecksilber(II)-acetataddukten

1. Allgemeines

Durch Hochvakuumdestillation mit Hilfe von Ringspaltsäulen hatte man eine Auftrennung der Gesamtfettsäuremethylester in Fraktionen einheitlicher Kettenlänge erreicht. Die nächste Aufgabe bestand nun darin, diese Fraktionen in solche einheitlichen Sättigungsgrades zu zerlegen.

Zur Lösung dieser Aufgabe bietet sich vornehmlich ein Verfahren an, das auf eingehende frühe Untersuchungen von K. A. HOFMANN und J. SAND (16, 17, 18) zurückgreift und die Reaktion zwischen Quecksilber(II)-acetat und Olefinen in methanolischer Lösung zur Grundlage hat. Behandelt man Olefine mit Quecksilber(II)-acetat in methanolischer Lösung, so lagert sich das Salz in folgender Weise an die Doppelbindung an:



In dieser Reaktion entstehen Quecksilberaddukte, aus denen man die Olefine durch Spaltung mit schwachen Säuren zurückgewinnen kann. Erst in der zweiten Hälfte dieses Jahrhunderts konnte die Natur dieser "Addukte" von COTTON und LETO (19) mit Hilfe der Protonenresonanz geklärt werden. Danach handelt es sich bei den Quecksilberacetataddukten um echte, kovalente Verbindungen und nicht, wie früher (20, 21) vielfach angenommen, um π -Komplexe, wie sie beispielsweise zwischen Olefinen und Silber-, bzw. Platinsalzen entstehen können.

S. H. BERTRAM (3) wandte diese Reaktion zwischen Quecksilberacetat und einer olefinischen Doppelbindung dann bei der Abtrennung der Ölsäure von Stearinsäure zum erstenmal auf ungesättigte Fettsäuren an. Erst sehr viel später entwickelten E. JANTZEN et al. (22) unter Zugrundelegung obiger Reaktion eine sehr exakt arbeitende Methode, um ungesättigte Fettsäuren über ihre Quecksilberaddukte chromatographisch nach dem Sättigungsgrad voneinander trennen zu können. Dabei konnte H. ANDREAS (40) zunächst zeigen, daß cis-konfigurierte ungesättigte Fettsäuren etwa zehnmal schneller mit Quecksilber(II)-acetat reagieren als die stereoisomeren trans-Verbindungen. Dieses Ergebnis nutzte dann B. KUCHENBUCH (23) zur Trennung einiger cis-trans-isomerer Fettsäuren aufgrund unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeiten aus.

Eingehende Untersuchungen von K. MORGENSTERN und R. HOFMANN (24, 25) zeigten, daß bei Anwesenheit mehrerer Doppelbindungen im Molekül alle mit Quecksilberacetat reagieren können. R. HOFMANN (26) gelang es schließlich, diese Methode sogar zur Isolierung hochreiner Eikosapentaen- und Dokosahexaensäuren nutzbar zu machen. Damit war ein Weg gewiesen, ungesättigte Fettsäuren mit ein bis sechs Doppelbindungen im Molekül durch Chromatographie ihrer Quecksilberaddukte an Kieselgel nach dem Sättigungsgrad aufzutrennen und auf diese Weise zu hochreinen Präparaten zu gelangen.

Die Quecksilberaddukte ungesättigter Fettsäuremethylester fallen in Form mehr oder weniger stark viskoser Flüssigkeiten an. Die Viskosität steigt dabei mit zunehmendem Methoxymerkurierungsgrad an. Wandert die Doppelbindung an das Methylende der Kohlenstoffkette (Vinylstruktur!), so erhält man sogar kristalline Präparate.

2. Chromatographie der Quecksilberaddukte ungesättigter Fettsäuremethylester

Setzt man ein Gemisch ungesättigter Fettsäuren oder ihrer Methylester in methanolischer Lösung mit einer ausreichenden Menge an Quecksilber(II)-acetat um, so werden sämtliche Doppelbindungen methoxymerkuriiert. Hat man die entstandenen Addukte von überschüssigem Quecksilbersalz und der bei der Reaktion entstandenen Essigsäure befreit, so nimmt man in einem geeigneten unpolaren Lösungsmittel auf und gibt diese Lösung zur Chromatographie auf eine Kieselgelsäule. Gesättigte Säuren, die nicht mit Quecksilberacetat reagieren, lassen sich gleich zu Beginn des Trennungsganges wieder mit unpolaren Lösungsmitteln, wie z. B. Benzol, eluieren. Die aus den einzelnen Sättigungsgraden entstehenden Addukte weisen unterschiedliche Haftfestigkeit an Kieselgel auf. Dies kann zu ihrer Trennung nutzbar gemacht werden. Die Haftfestigkeit steigt von den Monoaddukten über die Di- und Triaddukte bis zu den Hexaaddukten hin an. Wandert man deshalb in der eluotropen Reihe für polare Adsorptionsmittel zu Eluentien höherer Dielektrizitätskonstanten, so können mit Äther die Monoaddukte, mit Essigester/Eisessig die Addukte der Diene und mit Methanol/Eisessig schließlich die der Triene und aller niederen Sättigungsgrade nacheinander vom Gel abgelöst werden.*¹) Zwischen Mono- und Diaddukten bestehen erhebliche Unterschiede in der Haftfestigkeit am Kieselgel. Diese Unterschiede sind zwischen Di- und Triaddukten ebenfalls noch deutlich; sie nehmen dann aber doch recht schnell ab, so daß zur Trennung zwischen Tri- und Tetraaddukten das Laufmittelgemisch weiter abgestuft werden muß. Addukte drei- und vierfach-ungesättigter Fettsäuren lassen sich nur noch unter besonderen Bedingungen mit einem Gemisch von Essigester, Methanol und Eisessig voneinander scheiden (s. S. 75). Liegen daneben noch Addukte höher ungesättigter Säuren im Gemisch vor, z.B. Penta- und Hexaaddukte, so muß diese Elutionschromatographie verlassen, und ein anderes Verfahren gewählt werden.

*¹) Der Gang der Trennung ließ sich dabei sehr leicht durch Tüpfeln des abtropfenden Elutes mit alkoholischer Lösung von Diphenylcarbazon verfolgen.

Bei Anwendung der Elutionschromatographie wird das Gemisch der Addukte in benzolischer Lösung an Kieselgel festgehalten, dessen Menge mehrfach so groß ist, als zur Adsorption sämtlicher Addukte erforderlich wäre. Diese Kieselgelmenge errechnet sich nach dem Ansatz (25):

$$\text{Kieselgel } *) \text{ (g)} = \frac{\text{Jodzahl} \cdot \text{Ester (g)}}{3}$$

Für 1 g Linolensäuremethylester (Jodzahl 260) wären demnach rund 87 g Kieselgel erforderlich. Diese Entwicklungstechnik wird man immer dann wählen, wenn es darum geht, die Addukte der Monoene, Diene oder Triene voneinander zu trennen, und wenn auf eine Isolierung niederer Sättigungsgrade kein Wert gelegt wird. Will man andererseits gerade die Addukte der höher-(vier- bis sechsfach-)ungesättigten Säuren isolieren, so ist es vorteilhaft, nach der Methode der Verdrängungstechnik zu arbeiten, und die Kieselgelmenge nur so groß zu bemessen, daß sie zur vollständigen Adsorption des höchsten Adduktes gerade nicht mehr ausreicht. Gibt man die benzolische Lösung eines solchen Adduktgemisches auf eine Kieselgelsäule, dann werden zunächst alle Sättigungsgrade adsorbiert. Nach und nach verdrängt jedoch das höchste Addukt (dieses haftet am festesten auf der Säule) alle anderen und kann somit in relativ kurzer Zeit und mit geringen Lösungsmittelvolumina rein erhalten werden. Setzt man den Trennungsgang mit den noch im Elut befindlichen Addukten fort, so lassen sich auf diese Weise nacheinander auch die nächst niederen Addukte gewinnen. Liegen die Addukte aller Sättigungsgrade vor, dann wird man zweckmäßigerweise beide Verfahren miteinander kombinieren.

Arbeitet man nach dem Verdrängungsverfahren, dann ist die Kenntnis der Beladungsfähigkeit des Kieselgels mit den einzelnen Addukten erforderlich. Die Werte für die Addukte ein- bis sechsfach-ungesättigter Fettsäuremethylester wurden von R. HOFMANN (25, 26) bestimmt und zunächst mit der Dimension g Addukt/1000 g Kieselgel angegeben. Praktischer ist es

*) Zur Verwendung kam Kieselgel für Verteilungschromatographie der Firma Riedel-de Haën, Seelze (Aktivitätsstufe II).

allerdings, mit der Dimension $\left[\frac{\text{g Kieselgel}}{\text{g Ester}} \right]$ zu rechnen.

Man erhält dann, einheitlich für alle Sättigungsgrade, Werte um 13,5. Diese Werte konnten bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Trennungen verwandt werden.

Hat man die verschiedenen Sättigungsgrade durch Chromatographie voneinander abgetrennt, dann können die Addukte mit Rhodanwasserstoffsäure zersetzt und so die Ester wieder zurückgewonnen werden.

Bei der Trennung ungesättigter Fettsäuren mit Hilfe ihrer Quecksilberaddukte wurden cis-trans-Isomerisierungen nur in untergeordnetem Maße (0,5 bis 1 %) beobachtet. Man erhält den eingesetzten Ester normalerweise in der ursprünglichen Konfiguration zurück.

Das Verfahren der chromatographischen Trennung ungesättigter Fettsäuren mit Hilfe ihrer Quecksilberaddukte konnte mit Erfolg bei der Untersuchung einer Reihe natürlich vorkommender Fette angewandt werden. So klärte F. BANDTE (27) die Zusammensetzung des Hefefettes, B. JÄGER (28, 29) die des Oliven- und Leinöls auf. Durch M. K. SINGH wurde das Fettsäuremuster des Sesamöls vorgelegt. R. HOFMANN (25, 30) schließlich konnte in zwei detaillierten Studien wesentliches zur Kenntnis der Fettsäuren des Dorsch- und Rüböls beitragen.

Bei richtiger Anwendung des geschilderten Verfahrens gelingt es, sehr saubere Präparate selbst hochungesättigter Fettsäuren zu isolieren. Solche hochreinen Präparate sind notwendig, wenn die Struktur ungesättigter Fettsäuren geklärt und die Lage vorhandener Doppelbindungen im Molekül fixiert werden soll.

F. Bestimmung der Lage der Doppelbindungen in ungesättigten Fettsäuren durch oxydative Spaltung

Es gilt heute als bekannt, daß die in tierischen und pflanzlichen Fetten vorkommenden ungesättigten Fettsäuren meist keine Reinsubstanzen, sondern in der Regel Gemische Stellungsisomere sind. Im Pflanzenreich sind Ausnahmen bisher nur bei den essentiellen Fettsäuren (Linol- und Linolensäure) beobachtet worden. Um solche Stellungsisomere ungesättigten Säuren erkennen zu können, und um die Lage der in ihnen vorhandenen Doppelbindungen festzulegen, bedient man sich der Methode der oxydativen Spaltung.

Danach wird das ungesättigte Molekül an der oder den Doppelbindungen vom Oxydationsmittel angegriffen und gespalten. Durch Untersuchung der entstandenen Spaltprodukte gelingt es, die gewünschten Aussagen über die Lage der Doppelbindungen und über vorhandene Stellungsisomere machen zu können.

Zahlreiche Oxydationsmittel wurden in der Literatur vorgeschlagen und untersucht: Chromsäure, Salpetersäure, Wasserstoffperoxid, organische Persäuren, Kaliumpermanganat, Bleitetraacetat, Ozon und Natriummetaperjodat/Kaliumpermanganat. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das Verfahren der oxydativen Spaltung mit Natriummetaperjodat/Kaliumpermanganat nach der Methode von E. von RUDLOFF (31, 32) benutzt. B. JÄGER (29) und R. HOFMANN (25) hatten dieses Verfahren mit Erfolg benutzen können und übereinstimmend festgestellt, daß es praktisch keine Nebenprodukte, z. B. durch Überoxydation, lieferte. Es ist dies der große Vorteil der Spaltung nach v. RUDLOFF gegenüber den anderen oben aufgezählten Oxydationsmitteln.

Nach dieser Methode vollzieht man die Oxydation der ungesättigten Fettsäuren in großer Verdünnung ($< 0,1\%$) und schwach karbonatalkalischem Medium ($P_H 7 - 8$) mit wässrigem tert.-Butanol als Lösungsmittel. Oxydationsmittel ist

Natriummetaperjodat unter Zusatz katalytischer Mengen von Kaliumpermanganat. Die Reaktion verläuft zunächst so, daß mit KMnO_4 Keto-hydroxy- bzw. Dihydroxysäuren entstehen. Diese zerfallen dann durch den Angriff des Natriummetaperjodats in zwei Spaltstücke, aus denen in der letzten Reaktionsstufe mit Permanganat schließlich Carbonsäuren gebildet werden. Perjodat geht dabei in Jodat über. Das Permanganat wird in der schwach-alkalischen Lösung ständig regeneriert und wirkt daher nur katalytisch. Aus ungesättigten Monocarbonsäuren erhält man nach v. RUDLOFF als Spaltstücke jeweils eine gesättigte Monocarbonsäure und eine gesättigte Dicarbonsäure. Bei zwei- und mehrfach-ungesättigten Fettsäuren mit isolierten Doppelbindungen (Divinylmethanrhythmus: $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) sollte das zwischen den Doppelbindungen liegende Kettenstück in Form von Malonsäure anfallen. Malonsäure konnte bisher jedoch niemals gefaßt werden. V. RUDLOFF selbst vermutete, daß die Malonsäure gleich weiter abgebaut wird. Jedoch sind Einzelheiten darüber nicht bekannt.

Es kann als ein Nachteil des Rudloffschen Verfahrens angesehen werden, daß man dieses Bruchstück nicht fassen kann. Hat man jedoch durch Jodzählbestimmung den Sättigungsgrad ermittelt, weiß man durch das Ergebnis der katalytischen Hydrierung über die Kettenlänge Bescheid, und stehen ferner die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen im UV zur Verfügung, so lassen sich durch Bestimmung der angefallenen Spaltsäuren auch in mehrfach-ungesättigten Säuren eindeutige Aussagen über die Lage der Doppelbindungen und über die Anwesenheit von Stellungsisomeren machen. Voraussetzung ist allerdings, daß in jedem Fall nur sehr reine Präparate zur Untersuchung eingesetzt werden. Bei einfach-ungesättigten Säuren stimmt die Summe der C-Atome beider Spaltstücke mit der vor der Spaltung vorhandenen Kohlenstoffkette überein. Bei Dienen (Trienen ... usw.) ist diese Summe um 3 (6 ... usw.) Einheiten kleiner. Liegen Stellungsisomere im Gemisch vor, so hat man diese durch

richtige Kombination zueinander passender Spaltstücke zu identifizieren.

Die bei diesem Verfahren anfallenden Spaltsäuren kann man papierchromatographisch identifizieren oder nach chromatographischer Trennung an gepufferten Kieselgelsäulen (33) durch Titration quantitativ bestimmen. Schneller und einfacher ist es aber, die Spaltprodukte in ihre Methylester zu überführen und diese gaschromatographisch zu untersuchen.

G. Spektroskopische Untersuchungen im UV und IR

Einzelheiten bezüglich der spektroskopischen Untersuchungen ungesättigter Fettsäuremethylester im ultravioletten und infraroten Wellenbereich werden ausführlich im Anhang auf Seite 130 beschrieben.

Nähere Angaben zur Jodzahlbestimmung sind im Experimentellen Teil dieser Arbeit auf Seite 123 enthalten.

SPEZIELLER TEIL

I. Isolierung und Identifizierung der im Fett der menschlichen Fettleber enthaltenen Säuren

A. Dodeka- und Tetradekasäuren

1. n-Dodekan- und n-Tetradekansäure

Zur Isolierung der n-Dodekan- und n-Tetradekansäure bot sich eine Fraktion der ersten Hauptdestillation an: Bei einer Siedetemperatur von 113 °C in der Blase und 75 °C im oberen Kolonnenabschnitt konnten in einer mit fester Kohlensäure auf - 78 °C abgekühlten Falle 244 mg an Destillat gewonnen werden. Diese Fraktion enthielt nach gaschromatographischer Analyse zur Hauptsache gesättigte Ester der Kettenlänge C₁₂ und C₁₄ mit folgender prozentualer Zusammensetzung:

Fraktion I (Kühlfalle):	C ₁₂	= 30 %
	C ₁₄	= 50 %
	C ₁₄ -Monoen	= 10 %
	C ₁₆ -Monoen	= 10 %

Es bestand also die Möglichkeit, nach Abtrennung der ungesättigten Anteile über Quecksilberaddukte, die gesättigten Komponenten C₁₂ und C₁₄ im Gemisch zu fassen und anschließend die Dodekansäure von der Tetradekansäure durch Destillation im Horizontalrohr zu trennen.

Dazu wurde die gesamte Fraktion (244 mg, Jodzahl 27,3) mit 300 mg Quecksilber(II)-acetat in 10 ml Methanol umgesetzt und zur Bildung der Addukte zwei Tage lang im Dunkeln stehen gelassen. Anschließend dampfte man die Adduktlösung bei einer Temperatur von 30 °C im Vakuum zur Trockne ein und

extrahierte den verbliebenen weißen Rückstand mehrmals mit Benzol. Um die bei der Reaktion gebildete Essigsäure zu entfernen, wurde die benzolische Lösung der Addukte im Vakuum bei 10^{-4} Torr sehr sorgfältig vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in 10 ml Benzol gelöst und langsam auf eine Säule mit 3 g Kieselgel gegeben. Mit zwei Säulenvolumina*) Benzol konnten die gesättigten Ester wiedervon der Säule abgelöst werden. Nachdem man das Lösungsmittel entfernt hatte, wurde der Rückstand mit methanolischer Kalilauge gekocht und die entstandene Seifenlösung mehrmals zur Entfernung eventuell vorhandener Anteile an Unverseifbarem mit Petroläther (Kp. 60 - 70 °C) geschüttelt. Dann säuerte man mit Schwefelsäure an und extrahierte die freien Fettsäuren mit Äther. Nach dem Vertreiben des Lösungsmittels blieben 102 mg zurück. Zur Trennung von Dodekan- und Tetradekansäure wurde dieser Rückstand der Destillation im Horizontalrohr unterworfen: In einem Glasrohr von 4,5 mm Innendurchmesser wurde im Wasserstoffstrom bei 12 Torr mit einer Substanzeinwaage von 25 mg destilliert. Die Temperatur der wärmeren Blockseite betrug dabei 170 °C, die der kälteren 135 °C. Aus zwei Destillationen wurden jeweils die niedrig- und hochschmelzenden Fraktionen isoliert, vereinigt und einer dritten und vierten Rohrdestillation unterworfen. In der dritten Destillation fielen insgesamt 25 Fraktionen mit Schmelzpunkten zwischen 43,8 und 44,0 °C an. Diese Fraktionen schienen aus reiner n-Dodekansäure zu bestehen. Unter dem Schmelzpunktmikroskop nach KOFLER ergaben sich folgende Werte:

n-Dodekansäure, isoliert	43,9 °C
n-Dodekansäure, rein	43,9 °C
Mischschmelzpunkt	43,9 °C.

*) Unter einem Säulenvolumen (SV) soll die Menge Lösungsmittel verstanden werden, die in der verwendeten Gelmenge während der Chromatographie enthalten ist. Für das benutzte Kieselgel galt:

$$\text{Säulenvolumen} = \text{Kieselgelmenge (g)} \cdot 1,6.$$

C_{14} -Gesättigt

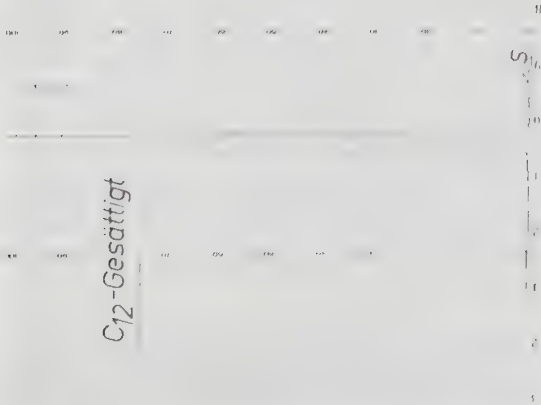


Abbildung 8

Gaschromatogramm von n-Dodekanoisäuremethylester aus menschlicher Fettleber (Trennbedingungen s. S. 26; polare Trennphase)

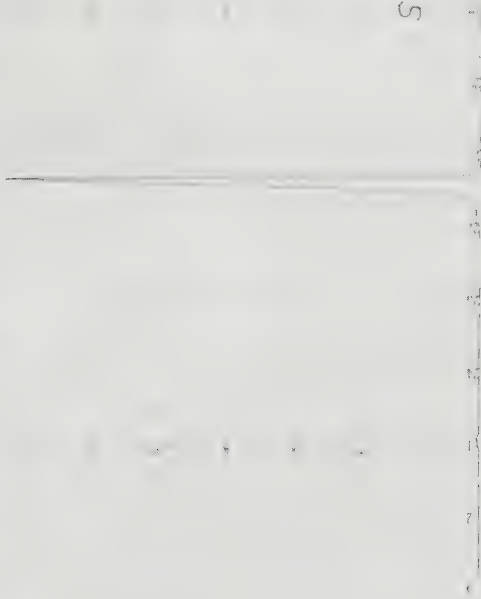


Abbildung 9

Gaschromatogramm von n-Tetradekansäuremethylester aus menschlicher Fettleber (Trennbedingungen s. S. 26; polare Trennphase)

Damit war die n-Dodekansäure isoliert und identifiziert. Abbildung 8^{*)} zeigt die gaschromatographisch hohe Reinheit der isolierten n-Dodekansäure.

Aus der vierten Rohrdestillation sollte die n-Tetradekansäure isoliert werden. Es wurden ebenfalls 25 Fraktionen gewonnen, deren Schmelzpunkte zwischen 54,0 und 54,3 °C lagen. Eine genaue Schmelzpunktbestimmung ergab folgende Werte:

n-Tetradekansäure, isoliert	54,2 °C
n-Tetradekansäure, rein	54,2 °C
Mischschmelzpunkt	54,2 °C.

Damit war auch die n-Tetradekansäure in reiner Form (siehe Abbildung 9^{*)}) isoliert und identifiziert.

2. Tetradecensäuremethylester

a) Gewinnung

Aus dem Gaschromatogramm der Gesamtfettsäuremethylester (Abbildung 1) war auf die Anwesenheit geringer Mengen Tetradecensäure zu schließen. Eine Anreicherung mit nachfolgender Reindarstellung dieser Säure schien nur aus den niedrigsiedenden Fraktionen jeder Hauptdestillation erfolgversprechend. So wurden die in den auf - 80 °C abgekühlten Fällen ausgefrorenen Anteile der Destillationen II, III, IV, V und VI mit den Fraktionen I₁, IV₁ - 3, V₁ - 3 und VI₁ + 2 vereinigt. Auf diese Weise standen 2,8 g Fettsäuremethylester zur Verfügung. Zur Entfernung von eventuell vorhandenem Unverseifbaren wurden diese Ester durch einstündiges Kochen

*) Wie diese und die später folgenden Gaschromatogramme zeigen, konnte mit der Methode der Ampullenzertrümmerung praktisch frei von Lösungsmittel chromatographiert werden.

unter Stickstoff mit methanolischer Kalilauge verseift. Die Seifen extrahierte man anschließend mehrfach mit Petroläther (Siedebereich 50 bis 70 °C). Nach dem Ansäuern wurden die freien Säuren mit Äther zurückgewonnen. Durch einstündiges Kochen mit methanolischer Salzsäure konnten schließlich 2,3 g Fettsäuremethylester erhalten werden, die gaschromatographisch folgende Zusammensetzung zeigten:

C ₁₂	15 %
C ₁₄	75 %
C ₁₄ -Monoen	8 %.

Daneben waren noch ca. 2 % Verunreinigungen in Form von Individuen verschiedener Sättigungsgrade der Kettenlänge C₁₆ und C₁₈ vorhanden. Um sie zu entfernen, empfahl sich eine Feindestillation dieser Fraktion in der Mikrosäule (s. S. 17). Bei einem Druck von 1,5 Torr*) wurden zwischen 96 und 118 °C*) vier Fraktionen aufgefangen. Zur weiteren Verarbeitung wurden nur die Fraktionen 3 und 4 verwendet. Die gaschromatographische Analyse zeigte, daß die Tetrade-censäure in diesen Fraktionen auf ca. 30 % angereichert werden konnte. Daneben enthielten beide Fraktionen nur noch gesättigte Anteile der Kettenlänge C₁₂ und C₁₄. Die ursprünglich vorhandenen Verunreinigungen waren nicht mehr zugegen, so daß jetzt der Versuch gemacht werden konnte, die Tetradecensäure aus den Fraktionen 3 und 4 über die Quecksilberaddukte säulenchromatographisch in reiner Form abzutrennen. Die Fraktionen 3 und 4 wurden deshalb vereinigt (600 mg, Jodzahl 31,4) und in 20 ml Methanol mit 1 g Quecksilberacetat zwei Tage im Dunkeln stehen gelassen. Anschließend dampfte man die methanolische Adduktlösung ein, nahm den Rückstand mit Benzol auf und filtrierte sorgfältig vom überschüssigen Quecksilbersalz ab. Die jetzt klare Lösung wurde nochmals voll-

*) Die Siedetemperaturen wurden am Kolonnenkopf, der Druck in der Vorlage gemessen.

ständig eingedampft, um so auch letzte Spuren von gebildeter Essigsäure zu entfernen. Der Rückstand wurde dann in 20 ml Benzol gelöst und auf eine Säule mit 8 g Kieselgel gegeben. Die gesättigten Ester konnte man mit 3 SV Benzol von der Säule ablösen, die Monoaddukte anschließend mit 2 SV Methanol/Eisessig (Volumenverhältnis 95 : 5) desorbieren.*) Das Methanol/Eisessig-Elut wurde zur Isolierung der Tetradecensäure vom Lösungsmittel befreit und zur Zersetzung der Addukte in methanolischer Lösung mit Salzsäure und Ammoniumrhodanid versetzt. Nach einstündigem Stehenlassen verdünnte man mit Wasser und extrahierte den ausgeschiedenen Tetradecensäuremethylester durch mehrfaches Ausschütteln mit Petroläther. Nach Vertreiben des Lösungsmittels wurde der Ester zur endgültigen Reinigung einer Destillation im Zweikugelrohr bei 10^{-3} Torr unterworfen. Danach standen 107 mg Tetradecensäuremethylester (siehe Abbildung 10) zur Verfügung. Die Jodzahlbestimmung lieferte einen Wert von 105,9 (Jodzahl_{ber.} 105,6). Das Hydrierungsprodukt der isolierten Verbindung führte zu gaschromatographisch reinem Tetradekansäuremethylester. Aus dem IR-Spektrum (siehe Abbildung 26) ergab sich, daß trans-Isomere nur zu etwa 4,6 % enthalten waren. Der Gehalt an Dien-Konjugen im nicht isomerisierten Ester betrug 0,8 %, der an Trien-Konjugen 0,2 %. Damit konnte die isolierte Verbindung als gaschromatographisch reiner cis-Tetradecensäuremethylester**) identifiziert werden.

*) Tränkte man einen Bogen Filtrierpapier mit alkoholischer Diphenylcarbazonlösung und fing von Zeit zu Zeit einen Tropfen des Elutes auf dem Papier auf, so ließ sich der Gang der Trennung an der Intensität der entstehenden violetten Flecken recht gut verfolgen.

**) Der Brechungsindex des Esters wurde zu $n_D^{20} = 1,4473$ bestimmt.
Ein Literaturwert stand nicht zur Verfügung.

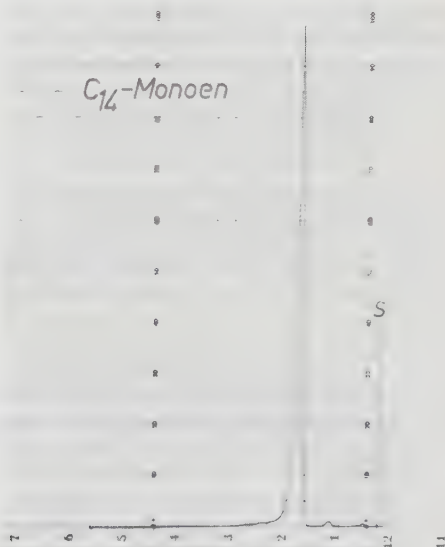
b) Oxydative Spaltung des Tetradecensäuremethylesters

Um die Lage der Doppelbindung im isolierten Tetradecensäuremethylester zu bestimmen, wurde eine oxydative Spaltung der Substanz nach dem Verfahren von E. v. RUDLOFF mit Natriummetaperjodat und Kaliumpermanganat in wässrigem tert.-Butanol durchgeführt. Dazu löste man 26 mg Tetradecensäureester in 22 ml tert.-Butanol mit einem Gehalt von 10 % Wasser und tropfte diese Lösung im Verlauf einer halben Stunde in ein Oxydationsmittelgemisch, bestehend aus 200 mg NaJO_4 , 4 mg KMnO_4 und 57 mg K_2CO_3 in 40 ml Wasser. Nach dreistündiger Reaktionszeit reduzierte man die braunrote Lösung durch Einleiten von Schwefeldioxid bis zum Auftreten einer Grünfärbung und machte dann alkalisch. Ausgefallenes Mangandioxidhydrat ließ man über Nacht absitzen, filtrierte am nächsten Morgen davon ab und dampfte das klare Filtrat im Vakuum bei 50 °C ein. Anschließend säuerte man den Rückstand an und extrahierte die freigesetzten Spalt-

Abbildung 10

Gaschromatogramm von
Tetradecensäure-
methylester aus
menschlicher Fettleber

(Trennbedingungen
s. S. 26;
polare Trennphase)



säuren mit Äther. Nach dem Verestern mit 2%iger methanolischer Salzsäure fielen 15 mg Spaltester an, die auf einer polaren und einer unpolaren Trennsäule bei verschiedenen Arbeitstemperaturen gaschromatographiert wurden. Dabei konnten folgende Spaltsäuren identifiziert werden:

Monocarbonsäuren $M_4, M_5, M_6, M_7, M_8, M_9, M_{10}$ ^{*)}

Dicarbonsäuren $D_4, D_5, D_6, D_7, D_8, D_9, D_{10}, D_{11}$.

Von diesen Spaltsäuren ließen sich folgende Paare zu einer Carbonsäure mit 14 C-Atomen, wie sie vor der oxydativen Spaltung vorgelegen hatte, kombinieren:

$D_4-M_{10} \quad D_5-M_9 \quad D_6-M_8 \quad D_7-M_7 \quad D_8-M_6 \quad D_9-M_5 \quad D_{10}-M_4$.

Bei der oxydativen Spaltung nach v. RUDLOFF tritt bekanntlich keine Malonsäure auf, so daß hier das Gegenstück zur D_{11} , nämlich Monocarbonsäure-3, fehlte. Da die Undekandisäure jedoch einwandfrei identifiziert wurde, bestand der isolierte Tetradecensäuremethylester somit aus einem vierteiligen Gemisch Stellungsisomerer mit Lage der Doppelbindung in

$\Delta 4, \Delta 5, \Delta 6, \Delta 7, \Delta 8, \Delta 9, \Delta 10$ und $\Delta 11$.

Die Berechnung der Anteile der einzelnen Stellungsisomeren in der Ausgangssubstanz erfolgte durch Auswertung der Flächen des Gaschromatogramms der Spaltester. Hierbei ergaben sich jedoch folgende Schwierigkeiten:

Die durch oxydative Spaltung der Ausgangssubstanzen angefallenen Säuren müssen zur gaschromatographischen Analyse in ihre Methylester überführt werden. Die hierzu notwendi-

*) Im folgenden wird eine normale gesättigte Monocarbonsäure bzw. ihr Methylester mit n C-Atomen auch als M_n und eine Dicarbonsäure mit m C-Atomen als D_m abgekürzt.

gen Operationen (Extraktion und nachfolgende Entfernung des Lösungsmittels) sind meist mit Substanzverlusten verbunden. Diese sind für die leichtflüchtigen Ester der Monocarbonsäuren mit weniger als acht C-Atomen und für die Dicarbonsäuren mit Kettenlängen unter fünf Kohlenstoffatomen besonders groß. Für die Errechnung der Anteile der einzelnen Isomeren im Ausgangsgemisch empfiehlt es sich deshalb, im Gaschromatogramm speziell die Flächen der schwerer flüchtigen Spaltester zu verwenden.

Für den vorliegenden Fall des Tetradecensäuremethylesters wurde die Berechnung daher unter Verwendung der Flächen der $D_6 - D_{11}$, M_9 und M_{10} durchgeführt. Danach ergab sich für den Tetradecensäuremethylester folgende Isomerenverteilung:

$\Delta 4$,	$\Delta 5$,	$\Delta 6$,	$\Delta 7$,	$\Delta 8$,	$\Delta 9$,	Δ_{10} ,	Δ_{11} ^{*)} .
2 %	6 %	1 %	11 %	1 %	78 %	1 %	1 %

Der aus menschlicher Fettleber isolierte Tetradecensäuremethylester bestand also aus einem Gemisch von acht Stellungsisomeren, in dem das $\Delta 9$ -Isomere (Myristoleinsäuretyp !) Hauptkomponente war. Daneben traten in nennenswerten Mengen aber auch die $\Delta 7$ -Stellung (Palmitoleinsäuretyp !) und $\Delta 5$ -Stellung (Ölsäuretyp !) in Erscheinung. Wenn die übrigen Isomeren auch nur in Spuren zugegen waren, so konnte ihre Anwesenheit dennoch gesichert werden. Über die Zuordnung ungesättigter Fettsäuren zu bestimmten Fettsäuretypen siehe Seite 49 und 104.

*) Die quantitative Berechnung der Isomerenanteile aus dem Gaschromatogramm wurde unter Zuhilfenahme der vom Autor an anderer Stelle (34) für die gesättigten Mono- und Dicarbonsäuren bestimmten Flächenfaktoren durchgeführt.

B. Pentadekensäuren

Von den Pentadekensäuren konnte lediglich die n-Pentadekansäure in einigen Destillatfraktionen gaschromatographisch nachgewiesen werden. Die Menge war jedoch so gering, daß von einer Anreicherung und Isolierung dieser Säure Abstand genommen wurde.

C. Hexadekensäuren

1. n-Hexadekansäure

In der 18. Fraktion der IV. Hauptdestillation standen 3,4 g Fettsäuremethylester (Jodzahl 8,7) zur Verfügung, die laut Gaschromatogramm als Hauptkomponente Palmitinsäuremethylester enthielt. Um zu gaschromatographisch reiner Palmitinsäure zu kommen, wurden 3,0 g der Fraktion IV₁₈ mit 0,700 g Quecksilber(II)-acetat in 17,5 ml Methanol umgesetzt und in die Addukte verwandelt. Nach Aufarbeitung wurden die Addukte in 10 ml Benzol gelöst und auf eine Säule mit 7 g Kieselgel gegeben. Mit 2 SV Benzol eluierte man die gesättigten Anteile wieder vom Gel. Nach dem Vertreiben des Lösungsmittels hinterblieben 2,2 g Palmitinsäureester, die nur noch geringe Mengen an Tetradekan- und Oktadekansäureester enthielten. Zur Entfernung dieser Nachbarkettenlängen bot sich wiederum die Destillation im Horizontalrohr an. Dazu wurden 500 mg Palmitinsäureester verseift, von eventuell vorhandenem Unverseifbaren befreit und in die Säure überführt. Aus 500 mg Ester erhielt man dabei 415 mg Säure. In einem Glasrohr von 4,5 mm lichter Weite destillierte man bei einem Temperaturgefälle von 40 °C (die Temperatur der wärmeren Seite betrug 210 °C, die der kälteren Seite 170 °C)*. Dabei fielen bei einem Einsatz von 25 mg Substanz 22 Fraktionen mit Schmelzpunkten zwischen 62,1 und 62,9 °C an. Die 4. bis 22. Fraktion (Fp. 62,8 - 62,9 °C) wurde ver-

*) Es wurde bei einem Druck von 15 Torr destilliert.

einigt und einer genauen Schmelzpunktbestimmung unterzogen:

n-Hexadekansäure, isoliert	62,6 °C
n-Hexadekansäure, rein	62,5 °C
Mischschmelzpunkt	62,6 °C

C₁₆-Gesättigt

Abbildung 11

Gaschromatogramm von n-Hexadekansäuremethylester aus menschlicher Fettleber
(Trennbedingungen s. S. 26;
polare Trennphase)

Das Gaschromatogramm des isolierten Esters (Abbildung 11) zeigte nur eine einzige Spitze. Damit war auch die n-Hexadekansäure isoliert und identifiziert.

2. Hexadecensäuremethylester

a) Gewinnung

In den vereinigten Destillatfraktionen IV₈ + 9, V₅ und VI₅ waren 922 mg Fettsäuremethylester verfügbar, die nach gaschromatographischer Analyse zur Hauptsache aus Hexadecensäuremethylester bestanden. Zur Gewinnung gaschromatographisch reiner Hexadecensäure mußten zunächst eventuell vorhandene Anteile an Unverseifbarem entfernt werden. Aus 922 mg Ausgangssubstanz standen danach 659 mg Fettsäuremethylester (Jodzahl 76,9) zur weiteren Aufarbeitung zur Verfügung. Diese Menge wurde zur Bildung der Addukte mit 1,27 g Quecksilber(II)-acetat in 32 ml Methanol zwei Tage im Dunkeln stehen gelassen. Anschließend arbeitete man in gewohnter Weise auf und gab die entstandenen Addukte in benzolischer Lösung auf eine Säule mit 22 g Kieselgel. Mit Benzol (2 SV) wurden die begleitenden gesättigten Ester eluiert. Anschließend konnten die Monoaddukte mit 1 SV Methanol/Eisessig (Volumenverhältnis 95 : 5) wieder von der Säule abgelöst werden. Nach Zersetzung dieser Addukte mit Ammoniumrhodanid und Salzsäure und anschließender Aufarbeitung (s. S. 121) fielen 320 mg Ester an, die zur endgültigen Reinigung noch einer Kurzwegdestillation im Zweikugelrohr unterworfen wurden. Auf diese Weise wurden 294 mg Hexadecensäuremethylester der Jodzahl 94,4 (theoretische Jodzahl 94,6) in Form einer wasserhellen, leichtbeweglichen Flüssigkeit erhalten. Das Hydrierungsprodukt konnte gaschromatographisch als reiner Palmitinsäureester erkannt werden. Nach dem IR-Spektrum (Abbildung 27) war die Anwesenheit trans-Isomere auszuschließen. Aus dem UV-Spektrum der nicht isomerisierten Substanz ergab sich, daß Konjuene nur in verschwindender Menge zugegen waren (Dien-Konjuen: 0,4 %; Trien-Konjuen: 0,06 %). Als Brechungsindex wurde ein Wert von $n_D^{20} = 1,4503$ für den

Ester gefunden (Literaturwert^{*)} = 1,4499). Damit war die isolierte Verbindung als reiner cis-Hexadecensäuremethylester identifiziert. Durch gaschromatographische Analyse (s. Abbildung 12) konnte die hohe Reinheit des Präparates bewiesen werden.

b) Oxydative Spaltung des Hexadecensäuremethylesters

Zur Fixierung der Lage der Doppelbindung im isolierten Hexadecensäuremethylester wurde eine oxydative Spaltung durchgeführt. 72 mg Hexadecensäureester wurden in 35 ml wässerigem tert.-Butanol gelöst und langsam in eine Oxydationslösung, bestehend aus 420 mg NaJO_4 , 7 mg KMnO_4 und 105 mg K_2CO_3 in 75 ml Wasser, eingetropft. Nach dreistündiger Reaktionszeit arbeitete man in der oben (s. Seite 41) beschriebenen Weise auf die Spaltsäuren hin auf. Dabei fielen 50 mg an Spaltsäuren an, die durch Kochen mit methanolischer Salzsäure in die zugehörigen Ester überführt wurden. Die gaschromatographische Analyse (auf verschiedenen Trennsäulen und bei unterschiedlichen Arbeitstemperaturen) zeigte die Anwesenheit der Mono- bzw. Dimethylester folgender Säuren an:

Monocarbonsäuren M_5 , M_7 , M_9 , M_{10}

Dicarbonsäuren D_6 , D_7 , D_9 , D_{11} .

*) Als Literaturwerte sind, wenn nicht anders vermerkt, die von R. HOFMANN (30, 25) bei der Untersuchung des Rüb- und Dorschöls ermittelten Werte aufgeführt.



Abbildung 12

Gaschromatogramm von Hexadecensäuremethylester aus menschlicher Fettleber

(Trennbedingungen s. S. 26;
polare Trennphase)

Zu einer Kettenlänge von 16 C-Atomen ließen sich danach kombinieren:

$D_6 - M_{10}$ $D_7 - M_9$ $D_9 - M_7$ und $D_{11} - M_5$.

Damit konnte der isolierte Hexadecensäuremethylester als Gemisch des

$\Delta 6-$, $\Delta 7-$, $\Delta 9-$ und $\Delta 11-$ Isomeren

identifiziert werden. Der Hexadecensäureester bestand somit wie der Tetradecensäureester aus einem mehrteiligen Gemisch Stellungsisomeren.

Zur Errechnung der Anteile der einzelnen Isomeren wurden die Flächen der D_9 , D_{11} , M_9 und M_{10} ausgewertet. Danach ergab sich für die verschiedenen Stellungsisomeren im Hexadecensäuremethylester folgende Verteilung:

$\Delta 6$,	$\Delta 7$,	$\Delta 9$,	$\Delta 11$.
3 %	11 %	84 %	2 %

Es überwiegt also bei weitem das $\Delta 9$ -Isomere, gefolgt vom $\Delta 7$ -Isomeren. Damit scheinen die Ergebnisse der oxydativen Spaltung von Tetradecen- und Hexadecensäuremethylester hinsichtlich der Verteilung der Hauptprodukte übereinzustimmen. Und doch bestehen hier grundsätzliche Unterschiede:

$\Delta 9$ -Tetradecensäureester ist vom sogenannten Myristoleinsäuretyp. *) Die erste Doppelbindung befindet sich hier in $\Delta (\omega - 5)$. $\Delta 9$ -Hexadecensäureester gehört dagegen einer ganz anderen Reihe, dem Palmitoleinsäuretyp $\Delta (\omega - 7)$ an. $\Delta 7$ -Tetradecensäureester ist danach ebenfalls vom Palmitoleinsäuretyp, wogegen das $\Delta 7$ -Isomere des Hexadecensäuremethylesters zum Ölsäuretyp $\Delta (\omega - 9)$ zu rechnen ist.

Die hier aufgezeigte und von E. KLENK (35) eingeführte Systematik, nach der die überwiegende Mehrzahl der ungesättigten Fettsäuren in solche vom Palmitolein-, Öl-, Linol- und Linolensäuretyp eingeordnet werden kann, soll im folgenden beibehalten werden.

Diese Systematik ist klar und gibt keinerlei Anlaß zu Verwechslungen. Sie schafft eindeutige Verhältnisse bei der Zuordnung einzelner Isomere in den im Hinblick auf die Anzahl stellungsisomerer ungesättigter Fettsäuren oft doch recht komplex zusammengesetzten nativen Fetten. Außerdem ermöglicht eine solche Einteilung Einblicke in die beim biochemischen Auf- und Abbau der Fettsäuren bestehenden genetischen Zusammenhänge (s. S. 109).

*) Siehe dazu auch Seite 104.

Der Myristoleinsäuretyp $\left[\Delta (\omega - 5) \right]$ wurde von KLENK nicht beschrieben. Dieser Typ konnte jedoch bei den niederen Fettsäuren mit bis zu 16 C-Atomen wiederholt auch von anderen Autoren (29, 44, 45) aufgefunden werden. Er soll deshalb in dieser Arbeit bei der systematischen Einteilung ungesättigter Fettsäuren mitaufgeführt werden.

Der Δ 9-Tetradecensäuremethylester war vom Myristoleinsäuretyp und mit 78 % Hauptvertreter des isolierten C_{14} -Monoens. Ihm entsprach nach KLENK das Δ 11-Isomere beim Hexadecensäureester, das hier jedoch nur noch in Spuren (2 %) zugegen war.

D. Heptadekasäuren

An die Untersuchung der Hexadekasäuren hätte sich normalerweise die der Heptadekasäuren angeschlossen. Die C_{17} -Säuren waren jedoch selbst in Destillatfraktionen, in denen diese Kettenlänge in angereicherter Menge hätte vorliegen müssen, nur in Spuren zugegen. Auf eine Isolierung der Heptadekasäuren, die wenig Aussicht auf Erfolg gehabt hätte, wurde deshalb verzichtet.

E. Oktadekasäuren

1. n-Oktadekansäure

Zur Gewinnung reiner n-Oktadekansäure schien die Fraktion IV_{31} (Jodzahl 47,8) geeignet. Diese Fraktion stand in einer Menge von 500 mg zur Verfügung und enthielt nach gaschromatographischer Analyse neben Ölsäure zur Hauptsache die gesuchte Stearinsäure. Um die gesättigten Anteile von den ungesättigten abzutrennen, wurde die gesamte Fraktion IV_{31} (500 mg) mit 530 mg Quecksilber(II)-acetat in 14 ml Methanol in die Addukte verwandelt. Anschließend arbeitete man in

gewohnter Weise auf, löste die isolierten Addukte in 10 ml Benzol und gab diese benzolische Adduktlösung langsam auf eine Säule ^{*)} mit 8 g Kieselgel. Mit 2 SV Benzol konnten die gesättigten Anteile wieder von der Säule eluiert werden. Nachdem man das Lösungsmittel vertrieben hatte, standen 300 mg gesättigte Fettsäuremethylester zur Verfügung, die mit methanolischer Kalilauge in die Seifen überführt und anschließend durch wiederholtes Ausschütteln mit Petroläther von eventuell vorhandenem Unverseifbaren befreit wurden. Nachdem man angesäuert hatte, konnten die freigesetzten Säuren durch Extraktion mit Äther gewonnen werden. Durch Verreiben des Lösungsmittels fielen dann 255 mg Oktadekansäure an. Zur Entfernung geringer Verunreinigungen in Form von Nachbarkettenlängen sollte eine Destillation im Horizontalrohr angeschlossen werden.

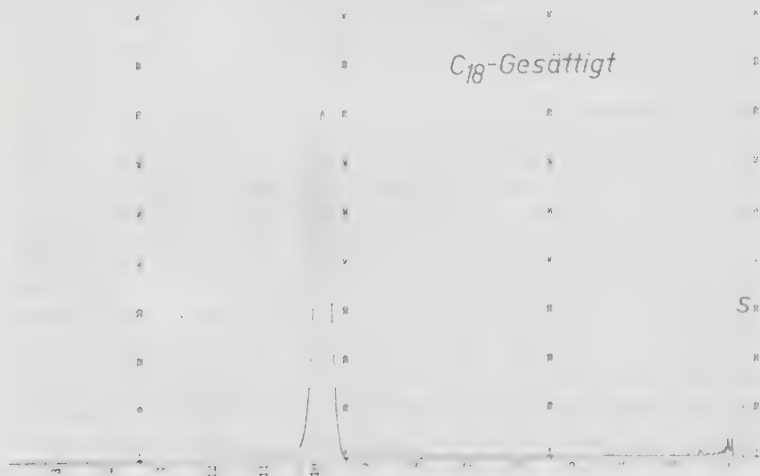


Abbildung 13

Gaschromatogramm von n-Oktadekansäuremethylester
aus menschlicher Fettleber
(Trennbedingungen s. S. 26; polare Trennphase)

*) Bei allen Adduktentrennungen war das Verhältnis zwischen der Höhe der Gelschicht in der Säule und dem Säulendurchmesser größer als 20 : 1.

Dazu wurden 25 mg Substanz im Wasserstoffstrom bei 12 Torr ausdestilliert. Auf der wärmeren Blockseite wurden dabei 220 °C gemessen. Die Temperatur der kälteren Seite betrug 185 °C. Dabei wurden 27 Fraktionen mit Schmelzpunkten zwischen 69,4 und 69,7 °C erhalten. Bei der exakten Schmelzpunktbestimmung unter dem Koflermikroskop ergaben sich folgende Werte:

n-Oktadekansäure, isoliert	69,4 °C
n-Oktadekansäure, rein	69,4 °C
Mischschmelzpunkt	69,3 °C.

Abbildung 13 zeigt das Gaschromatogramm des isolierten n-Oktadekansäuremethylesters. Damit konnte auch die Stearinsäure aus dem Fett der menschlichen Fettleber in hochreiner Form isoliert und identifiziert werden.

2. Oktadecensäuremethylester

a) Gewinnung

Zur Gewinnung gaschromatographisch reiner Ölsäure wurden die Fraktionen 15 und 16 der ersten Hauptdestillation vereinigt. Damit waren 5,0 g Fettsäuremethylester der Jodzahl 94,1 verfügbar, die nach gaschromatographischer Analyse zu etwa 85 % aus Ölsäure bestanden. Daneben waren noch etwa 10 % Linolsäure enthalten. Der Rest bestand aus gesättigten Estern der Kettenlänge C_{16} und C_{18} . Entfernte man nun zunächst die als Verunreinigung vorhandenen gesättigten Ester, so mußte es möglich sein, Öl- und Linolsäure über eine säulenchromatographische Trennung ihrer Quecksilberaddukte in einem Arbeitsgang in guter Reinheit zu gewinnen.

Zur Durchführung dieses Trennungsganges versetzte man 5,0 g Methylester der Fraktionen $I_{15} + 16$ in 300 ml Methanol mit 12,5 g Quecksilberacetat und arbeitete auf die Addukte hin auf. Diese wurden in 300 ml Benzol gelöst und auf eine Trennsäule mit 150 g Kieselgel gegeben. Man eluierte zunächst

die gesättigten Ester mit Benzol (420 ml entspr. 1,8 SV) als Fraktion 1. Anschließend konnte bereits mit dem Übergangslaufmittelgemisch Benzol/Äther (Volumenverhältnis 1 : 1) eine stark positive Quecksilberreaktion mit Diphenylcarbazon im Elut erhalten werden. Von diesem Laufmittelgemisch wurden 360 ml (1,5 SV) durch die Säule geschickt (Fraktion 2). Mit 2 SV reinem Äther (480 ml) blieb die Reaktion auf Quecksilber weiterhin stark positiv (Fraktion 3). Mit 1,5 SV (360 ml) Äther/Eisessig (Volumenverhältnis 95 : 5) wurde dann eine Zwischenfraktion aufgefangen (Fraktion 4). Schließlich konnte der Rest der auf der Säule haftenden Addukte mit 1 SV (240 ml) Essigester/Eisessig (Volumenverhältnis 95 : 5) vollständig desorbiert werden (Fraktion 5). Fraktion 1 wurde verworfen. Die Fraktionen 2 bis 5 arbeitete man getrennt auf die Methylester hin auf. Aus den Fraktionen 2 und 3 konnten dann insgesamt 2,6 g fast reine Ölsäure gewonnen werden. Fraktion 4 wurde als Zwischenfraktion ebenfalls verworfen. Aus der fünften

C₁₈-Monoen

Abbildung 14

Gaschromatogramm von Ölsäuremethylester aus menschlicher Fettleber (Trennbedingungen s. S. 26; polare Trennphase)

Fraktion gelang es schließlich, 200 mg fast reine Linol-säure zu isolieren. Über ihre weitere Reinigung wird auf Seite 55 berichtet. Da die abgetrennte Ölsäure noch Spuren niederer Sättigungsgrade (C_{18} -Dien und C_{18} -Trien) enthielt, wurde sie nochmals in ihr Quecksilberaddukt überführt, und der chromatographische Trennungsgang auf einer Säule mit 75 g Kieselgel wiederholt. 2,6 g Ölsäureester löste man dazu mit 6,0 g Quecksilberacetat in 150 ml Methanol auf. Mit 1,5 SV Benzol/Äther (1 : 1) und 1,5 SV Äther konnten die Monoaddukte wieder vollständig von der Trennsäule abgelöst werden. Nach Zersetzung der Addukte lagen dann 2,2 g Ölsäuremethylester der Jodzahl 86,3 (theoretische Jodzahl 85,6) vor. Die hohe Reinheit des Präparates wurde durch gaschromatographische Analyse (s. Abbildung 14) bestätigt. Das Hydrierungsprodukt des isolierten Ölsäureesters wurde gaschromatographisch als reiner Stearinsäuremethylester erkannt. Aus dem IR-Spektrum der Ölsäure (s. Abbildung 28) errechnete sich ein Gehalt von 3,4 % an trans-Isomeren. Der Dien-Konjungen-Gehalt des isolierten nicht isomerisierten Präparates betrug 0,3 %, der Trien-Konjungen-Gehalt 0,06 %. Als Brechungsindex ergab sich ein Wert von $n_D^{20} = 1,4522$ (Literaturwert = 1,4525). Damit war die abgetrennte Verbindung als reiner cis-Oktadecensäuremethylester identifiziert.

b) Oxydative Spaltung des Oktadecensäuremethylesters

Zur oxydativen Spaltung des eben isolierten Oktadecensäuremethylesters wurden 52 mg der Verbindung in 25 ml wasserhaltigem tert.-Butanol gelöst und anschließend langsam in ein Oxydationsmittelgemisch, bestehend aus 300 mg $NaJO_4$, 5 mg $KMnO_4$ und 70 mg K_2CO_3 in 50 ml Wasser, eingetropft. Nach dreistündiger Reaktionszeit arbeitete man in gewohnter Weise auf die Spaltprodukte hin auf. Nach Überführung in die Mono- bzw. Dimethylester fielen 40 mg Spaltester an. Durch gaschromatographische Analyse konnten folgende Säuren festgestellt werden:

Monocarbonsäuren	M_7 , M_9 , M_{10}
Dicarbonsäuren	D_8 , D_9 , D_{11} .

Zu einer Kettenlänge von 18 C-Atomen ließen sich danach kombinieren:

$$D_8 - M_{10} \quad D_9 - M_9 \quad \text{und} \quad D_{11} - M_7.$$

Die Ölsäure lag also als Gemisch des $\Delta 8$ -, $\Delta 9$ - und $\Delta 11$ - Isomeren vor. Die gaschromatographisch durchgeführte quantitative Auswertung der Flächeninhalte der D_8 , D_9 und D_{11} führte zu folgender Isomerenverteilung:

$\Delta 8$,	$\Delta 9$,	$\Delta 11$.
1 %	84 %	15 %

Hauptbestandteil der isolierten Ölsäure war also das $\Delta 9$ -Isomere vom Ölsäuretyp. Aber auch der $\Delta 11$ -Oktadecensäuremethylester (Palmitoleinsäuretyp !) konnte mit 15 % in beträchtlicher Menge nachgewiesen werden.

3. Oktadekadiensäuremethylester

a) Gewinnung

Bei der Isolierung des Ölsäuremethylesters (s. S. 52) waren 200 mg von fast reinem Linolsäuremethylester angefallen. Um für die folgende Konstitutionsbestimmung genügend Substanz zur Verfügung zu haben, wurde die Fraktion II₂₅ (4,5 g; Jodzahl 94,6) zur Gewinnung weiteren Linolsäureesters mit 11,3 g Quecksilberacetat und 290 ml Methanol in die Addukte verwandelt. Die benzolische Lösung der entstandenen Addukte (250 ml) gab man langsam auf eine Trennsäule mit 150 g Kieselgel und eluierte anschließend nacheinander mit den Laufmitteln Benzol (1,2 SV), Benzol/Äther (1,4 SV), Äther (2 SV), Äther/Eisessig (1,4 SV),

Essigester/Eisessig (1,2 SV) und Methanol/Eisessig (1,2 SV). Aus dem Essigester/Eisessig-Elut fiel nach Spaltung der Addukte 100 mg fast reiner Linolsäureester an. Aus den mit Methanol/Eisessig abgelösten Addukten ließen sich weitere 200 mg dieses Esters gewinnen, die allerdings noch geringe Verunreinigungen niederer Sättigungsgrade enthielten. Aus diesem Trennungsgang waren also insgesamt 300 mg C_{18} -Dien isoliert worden, die mit den bei der Aufarbeitung der Ölsäure angefallenen 200 mg vereinigt und nochmals in die Addukte überführt wurden. Dazu benötigte man 2,7 g Quecksilberacetat und 65 ml Methanol. Anschließend wurde auf einer Säule mit 30 g Kieselgel getrennt. Die Addukte wurden in 50 ml Benzol gelöst und auf die Säule gegeben. Dann eluierte man nacheinander mit Benzol (2 SV), Benzol/Äther (1 SV), reinem Äther (2 SV), Essigester/Eisessig (3 SV) und zuletzt mit 2 SV Methanol/Eisessig. Aus dem Essigester/Eisessig-Elut konnten nach Zersetzung der Quecksilberaddukte 430 mg Linolsäuremethylester zurückgewonnen werden. Nach Entfernung eventuell vorhandener unverseifbarer Anteile konnten dann 400 mg hochreine Linolsäure in Form ihres Methylesters vorgelegt werden (s. Abbildung 15). Die katalytische Hydrierung führte zu gaschromatographisch reinem Stearinsäuremethylester. Als Jodzahl wurde ein Wert von 171,8 (theoretische Jodzahl 172,4) bestimmt. Der Brechungsindex ergab sich zu $n_D^{20} = 1,4611$ (Literaturwert = 1,4620). Aus dem IR-Spektrum errechnete sich ein Gehalt von 19,5 % an trans-Isomeren (s. Abbildung 29). Da aus dem Infrarotspektrum der Ausgangssubstanz (s. Abbildung 25) die Anwesenheit trans-Isomerer praktisch ausgeschlossen werden konnte, darf angenommen werden, daß es sich hierbei um Artefakte handelte. Diese waren sehr wahrscheinlich durch die doch recht erhebliche Temperaturbelastung während der langen Destillationszeiten entstanden. Der Dien-Konjungen-Gehalt (Trien-Konjungen-Gehalt) der nicht isomerisierten Substanz lag mit 0,6 % (0,2 %) in normalen Grenzen. Aus dem UV-Spektrum des mit Alkali isomerisierten Esters (s. Abbildung 36) ergab sich das für all-cis-Dien-Konjuene charakteristische Absorptionsmaximum bei 232 nm. Die Substanz war

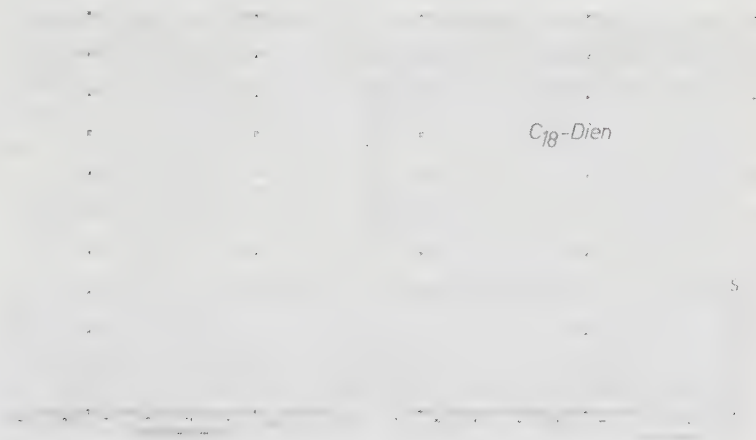


Abbildung 15

Gaschromatogramm von Linolsäuremethylester
aus menschlicher Fettleber
(Trennbedingung. s. S. 26;
polare Trennphase)

damit als reiner Linolsäuremethylester isoliert und identifiziert. Die Verbindung dürfte ursprünglich in der all-cis-Konfiguration vorgelegen haben.

b) Oxydative Spaltung des Oktadekadiensäuremethylesters

Bei der oxydativen Spaltung mehrfach-ungesättigter Fettsäuren muß ein entsprechend höherer Verbrauch an Oxydationsmittel veranschlagt werden, als er für die Spaltung der gleichen Menge einer einfach-ungesättigten Säure notwendig war. Für Diene ist dabei die doppelte, für Triene die dreifache und für höhere Polyene eine entsprechend größere Menge an Oxydationsmittel erforderlich.

49 mg des oben isolierten Linolsäuremethylesters wurden in 55 ml wässerigem tert.-Butanol gelöst und langsam in ein Oxydationsmittelgemisch von 805 mg NaJO_4 , 19 mg KMnO_4 , 205 mg K_2CO_3 und 120 ml Wasser eingetropft. Nach dreistündiger Reaktionszeit arbeitete man in gewohnter Weise auf. Die entstandenen Spaltsäuren (26 mg) wurden in ihre Mono- bzw. Dimethylester überführt und anschließend gaschromatographiert. Dabei konnte man die Spaltester folgender Säuren identifizieren:

Monocarbonsäuren	M_6 , M_7 , M_9
Dicarbonsäuren	D_6 , D_8 , D_9 .

Durch Ultraviolett-spektroskopie der Linolsäure hatte man die Anwesenheit isolierter Doppelbindungen sichergestellt (s. S. 56). Nach erfolgter Spaltung sollte daher das zwischen den Doppelbindungen befindliche Mittelstück in Form von Malonsäure faßbar sein. Bei der oxydativen Spaltung nach E. von RUDLOFF wurde Malonsäure bisher jedoch niemals gefunden (s. S. 33). Als Endprodukte der oxydativen Spaltung ungesättigter Fettsäuren entstehen immer Paare einer Mono- und einer Dicarbonsäure. Bei einfach-ungesättigten Säuren ist die Summe der C-Atome beider Spaltsäuren gleich der Kettenlänge der zur Spaltung eingesetzten Ausgangsverbindung. Bei Dienen (bzw. Trienen ... usw.) ist diese Summe um 3 (bzw. 6 ... usw.) Einheiten kleiner. Für den vorliegenden Fall des Linolsäuremethylesters konnten danach nur folgende der oben identifizierten Spaltester zu Paaren kombiniert werden:

$$D_6 - M_9$$

$$D_8 - M_7$$

$$D_9 - M_6 .$$

In jedem Fall erhält man aus der Summe der C-Atome der hier kombinierten Paare unter Hinzuzählen von 3 Einheiten (für die Malonsäure) wieder die ursprünglich vorhandene Kettenlänge von 18 C-Atomen.

Der aus menschlicher Fettleber isolierte Linolsäureester besaß im Divinylmethanrhythmus angeordnete isolierte Doppelbindungen und lag danach als Gemisch des $\Delta 6,9$ -, $\Delta 8,11$ - und $\Delta 9,12$ - Isomeren vor.

Unter Verwendung der Flächen der M_9 , D_8 und D_9 konnte dann aus dem Gaschromatogramm folgende quantitative Verteilung für die drei stellungsisomeren Diene errechnet werden:

$\Delta 6,9$	$\Delta 8,11$	$\Delta 9,12$
10 %	4 %	86 %

Hauptvertreter war also das $\Delta 9,12$ -Isomere vom Linolsäuretyp $\lfloor \Delta (\omega - 6) \rfloor$. Von den beiden anderen überwiegte das $\Delta 6,9$ -Isomere (Ölsäuretyp). Aber auch der dritte Vertreter, das $\Delta 8,11$ -Isomere (Palmitoleinsäuretyp) war eindeutig nachgewiesen worden.

4. Oktadekatriensäuremethylester

a) Gewinnung

Dreifach-ungesättigte Säuren der Kettenlänge C_{18} waren im Ausgangsgemisch (s. Abbildung 1) mit ca. 0,09 % nur sehr spärlich vertreten (s. auch die Zusammensetzung des menschlichen Leberfettes auf S. 94). Die Isolierung und Reindarstellung von Linolensäuremethylester war deshalb mit einer größeren Zahl von Anreicherungs-schritten verbunden. Aus insgesamt 5 Ansätzen konnte mit Hilfe der säulenchromatographischen Trennung über Quecksilber(II)-acetataddukte eine erfolgreiche Anreicherung des C_{18} -Triens durchgeführt werden:

1. Ansatz 11,6 g, bestehend aus den Fraktionen I₂₀ und III_{19, 20, 21, 23} (Jodzahl 85,4); dazu 29,0 g Quecksilber(II)-acetat in 725 ml Methanol.
2. Ansatz 10,0 g, bestehend aus den Fraktionen IV_{23 - 26} (Jodzahl 89,5); dazu 29,0 g Quecksilber(II)-acetat in 730 ml Methanol.
3. Ansatz 12,8 g, bestehend aus den Fraktionen VI_{18 - 21} (Jodzahl 80,4); dazu 27,0 g Quecksilber(II)-acetat in 700 ml Methanol.
4. Ansatz 10,0 g, bestehend aus den Fraktionen II_{23, 24, 26} (Jodzahl 87,0); dazu 22,0 g Quecksilber(II)-acetat in 550 ml Methanol.
5. Ansatz 10,0 g, bestehend aus den Fraktionen V_{23 - 28} (Jodzahl 90,3); dazu 23,0 g Quecksilber(II)-acetat in 580 ml Methanol.

Bisher hatte man zur Reindarstellung ungesättigter Fettsäuren mit Hilfe der säulenchromatographischen Trennung ihrer Quecksilberacetataddukte das Prinzip der Entwicklungschromatographie erfolgreich anwenden können. Hierbei wurden die zu trennenden Addukte in benzolischer Lösung an Kieselgel adsorbiert, dessen Menge mehrfach so groß war, als für die Adsorption aller Addukte notwendig gewesen wäre. Die adsorbierten Addukte der verschiedenen Sättigungsgrade löste man anschließend nacheinander mit speziellen Lösungsmitteln wieder von der Trennsäule ab.

Neben diesem Verfahren hatte sich, besonders bei der Abtrennung hochungesättigter, empfindlicher Fettsäuren aus einem Gemisch mit weniger stark ungesättigten Vertretern eine zweite Methode, die Verdrängungstechnik, bewährt. Hiernach wird die Gesamtmenge der entstandenen Addukte auf eine Trennsäule gegeben, deren Kieselgelmenge so berechnet ist, daß sie zur Adsorption des höchsten Adduktes, welches

gleichzeitig am festesten haftet, gerade nicht mehr ganz ausreicht. Beim langsamen Aufgeben der benzolischen Addukt-lösung werden anfangs zwar auch die niederen Addukte auf der Säule adsorbiert. Sie werden aber durch das am festesten haftende höchste Addukt schließlich wieder vollständig verdrängt. Dieses kann damit relativ leicht und schnell in hoher Reinheit gewonnen werden.

Bei der Aufarbeitung der zur Anreicherung der Linolensäure notwendigen 5 Ansätze sollte dieses Verfahren nun zum Einsatz kommen. Die aus diesen Ansätzen gewonnenen Quecksilberaddukte wurden nacheinander an Säulen mit jeweils 1,5 g Kieselgel chromatographiert. Man eluierte zunächst die niederen Addukte mit 3 SV Benzol und löste dann das am festesten haftende höchste Addukt mit 2 SV Methanol/Eisessig (95 : 5) wieder vom Gel ab. Auf diesem Wege konnten schließlich 640 mg einer an C_{18} -Trien stark angereicherten Fraktion erhalten werden. Gaschromatographisch war diese Fraktion folgendermaßen zusammengesetzt:

C_{18} -Monoen	2 %
C_{18} -Dien	55 %
C_{18} -Trien	35 %
C_{20} -Tetraen	9 %

Um zunächst das in einer Menge von 9 % vorhandene C_{20} -Tetraen zu entfernen, bildete man erneut die Addukte und chromatographierte anschließend auf einer Säule mit 1,2 g Kieselgel wieder nach dem Verdrängungsverfahren. Dabei wurde das Tetraen-Addukt vollständig festgehalten. Mit 2,5 SV Benzol eluierte man dann die Addukte von Trien, Dien und Monoen. Zur Isolierung von Linolensäureester wurde mit diesem Elut abschließend noch eine Entwicklungschromatographie durchgeführt. Dazu verwendete man eine Trennsäule mit 14 g Kieselgel. Mit 2 SV Äther/Eisessig (95 : 5) und 3,5 SV Essigester/Eisessig (95 : 5) konnte zunächst das Dien-Addukt vollständig von der Säule eluiert werden. Der Verlust an

Trien-Addukt war dabei gering. Das begleitende Monoen-Addukt wurde dabei selbstverständlich mitentfernt. Der gesuchte Linolensäuremethylester wurde dann als Quecksilberaddukt mit 2 SV Methanol/Eisessig (95 : 5) vom Sorbens abgelöst. Man zersetzte die Addukte sofort, entfernte eventuell vorhandene unverseifbare Anteile und überführte wieder in die Methylester. Nach abschließender Kurzwegdestillation im Zweikugelrohr bei 10^{-3} Torr fielen dann 49 mg Oktadekatriensäuremethylester an (s. Abbildung 16, Spitze a und b), die als einzige Verunreinigung etwa 1,5 % C_{18} -Dien (Spitze c der Abbildung 16) enthielten.

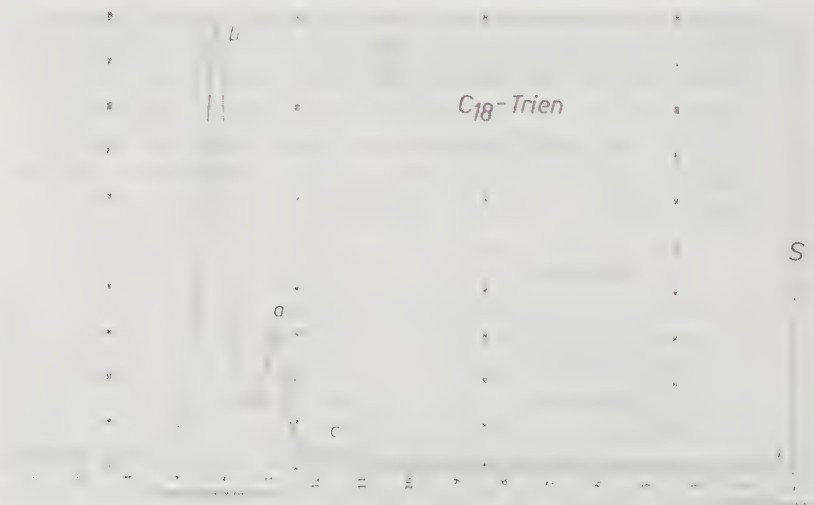


Abbildung 16

Gaschromatogramm von Oktadekatriensäuremethylester aus menschlicher Fettleber
(Trennbedingungen s. S. 26;
polare Trennphase)

Das Hydrierungsprodukt des isolierten Esters konnte gaschromatographisch als reiner Stearinsäureester identifiziert werden. Als Brechungsindex wurde ein Wert von

$n_D^{20} = 1,4719$ (Literaturwert = 1,4716) gemessen. Das UV-Spektrum (s. Abbildung 37) der mit Alkali isomerisierten Substanz zeigte die für all-cis-Trien-Konjuene typischen Absorptionsmaxima bei 258, 268 und 279 nm. Der Gehalt an Dien-Konjuen (bzw. Trien-Konjuen) im nicht isomerisierten C_{18} -Trien betrug 1,7 % (bzw. 0,5 %). Als Jodzahl wurde 251,7 (theoretischer Wert 260,4) gefunden. Das IR-Spektrum (s. Abbildung 30) deutete auf die Anwesenheit von ca. 23 % an trans-Isomeren. Da aus dem IR-Spektrum der Gesamtfettsäuremethylester jedoch nicht auf die Anwesenheit trans-Isomere zu schließen war, darf angenommen werden, daß es sich hier wiederum um Kunstprodukte handelte, die durch thermische Belastung der äußerst temperaturempfindlichen Substanz im Verlauf der Destillation entstanden waren. Die isolierte Substanz durfte somit als reiner Oktadekatriensäuremethylester angesprochen werden. Der Ester dürfte ursprünglich in der all-cis-Konfiguration vorgelegen haben.

Durch gaschromatographische Analyse waren die bisher isolierten Monoene und Diene der Kettenlänge C_{14} - C_{18} als hochreine Fettsäuremethylester erkannt worden. Obwohl die Ergebnisse der oxydativen Spaltung die isolierten Verbindungen als zum Teil vierteilige Gemische Stellungsisomere ausgewiesen hatten, konnte mit den verwendeten gepackten Trennsäulen für jede Substanz nur ein Peak erhalten werden. Offenbar sind die Unterschiede in den Retentionszeiten der einzelnen Stellungsisomere nicht groß genug, um sie im Gaschromatogramm in voneinander abgesetzten Spitzen erscheinen zu lassen. Eine solche Trennung gelingt erst, wenn man zu Säulen höchster Trennleistung (Kapillarsäulen) greift (36). Aber selbst dann gibt es noch zahlreiche Paare Stellungsisomere, die gemeinsam in einem Peak erscheinen (37). Im Fall des dreifach-ungesättigten Linolensäuremethylesters scheinen jedoch andere Verhältnisse vorzuliegen. Im Gaschromatogramm der Abbildung 16 erkennt man neben einer geringen Verunreinigung an C_{18} -Dien zwei fast vollständig voneinander getrennte Spitzen a und b. Durch die Ergebnisse der katalytischen Hydrierung, der Jodzahlbestimmung

und der Untersuchung im UV war die Verbindung einwandfrei als Ester der Kettenlänge C_{18} mit drei isolierten Doppelbindungen identifiziert worden. Niedere Sättigungsgrade (z. B. Tetraene oder andere) konnten ebenfalls ausgeschlossen werden. Nach der Sachlage blieb deshalb nur übrig, die Spitzen a und b zwei stellungsisomeren C_{18} -Trienen zuzuordnen. Um das zu klären, und um zu untersuchen, ob sich hinter einer der beiden Spitzen eventuell noch weitere Stellungsisomere verborgen hielten, sollte eine oxydative Spaltung des C_{18} -Triens angeschlossen werden.

b) Oxydative Spaltung des Oktadekatriensäuremethylesters

Zur oxydativen Spaltung nach v. RUDLOFF wurden 20 mg C_{18} -Trien in 25 ml wässrigem tert.-Butanol gelöst und langsam unter Rühren in ein Oxydationsmittelgemisch von 350 mg $NaJO_4$, 7 mg $KMnO_4$, 60 mg K_2CO_3 und 60 ml Wasser eingetropft. Nach drei Stunden wurde in gewohnter Weise auf die Spaltprodukte hin aufgearbeitet. Nachdem man in die zugehörigen Ester überführt hatte, konnte durch gaschromatographische Analyse die Anwesenheit folgender Spaltsäuren gesichert werden:

Monocarbonsäuren	M_3 , M_6
Dicarbonsäuren	D_6 , D_9 .

In dreifach-ungesättigten Fettsäuren mit isolierten Doppelbindungen wird bei der oxydativen Spaltung nach v. RUDLOFF zweimal das Bruchstück Malonsäure entstehen. Da Malonsäure nach den Ergebnissen der v. RUDLOFF-Spaltung jedoch nicht gefaßt werden kann, müssen in diesem Falle diejenigen Spaltsäuren miteinander kombiniert werden, deren Kohlenstoffzahlen zusammen um 6 Einheiten kleiner sind als die zur Spaltung eingesetzte Kette ursprünglich besaß. Das waren für das C_{18} -Trien die Paare:

D_6	-	M_6	und
D_9	-	M_3 .	

Damit war sichergestellt, daß die isolierte Linolensäure als Gemisch des Δ 6,9,12- und Δ 9,12,15- Isomeren vorgelegen hatte. Andere Stellungsisomere waren nicht zugegen. Aus den Flächen der Spaltsäuren D_6 und D_9 wurde folgende Verteilung für diese beiden Isomeren errechnet:

Δ 6,9,12	Δ 9,12,15 *)
14 %	86 %

Das Δ 6,9,12-Isomere mußte danach der Spitze a, das Δ 9,12,15-Isomere der Hauptspitze b der Abbildung 16 zugeordnet werden. Das durch oxydative Spaltung gefundene Verhältnis beider Isomere betrug also etwa 1 : 6. Es stimmte nicht ganz mit dem überein, das sich aus den Flächen des Gaschromatogramms der Abbildung 16 errechnen ließ. Danach mußte nämlich mit einem Verhältnis von ca. 1 : 4 gerechnet werden. Der Grund für diese Abweichung dürfte vielleicht darin zu suchen sein, daß der Anteil des Δ 6,9,12-Isomeren aus dem Flächeninhalt der D_6 errechnet wurde. Adipinsäure könnte sich als niedere Dicarbonsäure infolge Wasserlöslichkeit bei der Aufarbeitung der Spaltsäuren teilweise der Bestimmung entzogen haben.

Tatsächlich waren also im isolierten C_{18} -Trien nur zwei Stellungsisomere vorhanden. Beide gehörten verschiedenen Fettsäuretypen an. Δ 6,9,12-Oktadekatriensäure (auch als γ -Linolensäure bezeichnet) war vom Linolsäuretyp, wogegen das Δ 9,12,15-Isomere (üblicherweise als Linolensäure bezeichnet) dem Linolensäuretyp $\Delta(\omega - 3)$ angehörte.

F. Nonadekasäuren

Auf die Isolierung der Oktadekasäuren hätte die der Nonadekasäuren folgen sollen. Jedoch konnte diese Kettenlänge in keiner Destillatfraktion nachgewiesen werden.

*) Diese beiden stellungsisomeren C_{18} -Triene konnten an anderer Stelle von R. HOFMANN (26) aus dem Dorschöl und in sehr ähnlichem Verhältnis isoliert werden.

G. Eikosasäuren

1. Allgemeines

Zur Isolierung der gesättigten und ungesättigten Vertreter der Kettenlänge C_{20} wurden folgende Fraktionen der einzelnen Hauptdestillationen vereinigt:

I _{25,26,27}	II _{31,32}	III _{31,32,33}	IV _{33,34,35,36}
V _{39,40,41}	VI _{24,25,26}		

Zusammen ergaben sie eine Menge von 3,8 g, die zur Entfernung noch vorhandener leichter siedender Anteile der Kettenlänge C_{16} und C_{18} in der Mikrosäule aufdestilliert wurden. Als leichtsiedende Anteile wurden 600 mg abgezogen. Die Hauptmenge des Destillates (2,8 g; Jodzahl 212) konnte nun zur Isolierung der verschiedenen Sättigungsgrade aufgearbeitet werden.

2. n-Eikosansäure

Zur Gewinnung von n-Eikosansäure wurden von diesem Destillat 2,1 g mit 11,5 g Quecksilberacetat in 290 ml Methanol zur Adduktbildung umgesetzt. Nach Aufarbeitung löste man die entstandenen Addukte in 260 ml Benzol und chromatographierte an einer Säule mit 140 g Kieselgel nach dem Entwicklungsverfahren unter Verwendung folgender Elutionsmittel:

1. 1 SV Benzol (225 ml)
2. 1 SV Benzol/Äther (1 : 1)
3. 1 SV Äther
4. 2 SV Essigester/Eisessig (95 : 5)
5. 2 SV Methanol/Eisessig (95 : 5)

Aus dem Benzolelut konnten nach Abdampfen des Lösungsmittels 59 mg an fast reinem Eikosansäuremethylester isoliert werden. Zur Entfernung geringer Verunreinigungen in Form gesättigter Vertreter der Kettenlänge C_{18} und C_{22} führte man mit der freien Säure eine Destillation im Horizontalrohr durch. Aus 20 mg Substanz wurden bei 7 Torr und Temperaturen zwischen 225 und 185 °C in einem Glasrohr von 4 mm lichter Weite insgesamt 25 Fraktionen erhalten. Die Fraktionen 5 - 19 besaßen einen Schmelzpunkt von 75,0 °C und wurden vereinigt. Eine genaue Schmelzpunktbestimmung führte zu folgenden Ergebnissen:

n-Eikosansäure, isoliert	75,2 °C
n-Eikosansäure, rein	75,1 °C
Mischschmelzpunkt	74,9 °C

Damit wurde auch die n-Eikosansäure in reiner Form isoliert und identifiziert (s. Abbildung 17).

3. Eikosensäuremethylester

a) Gewinnung

Die zur Isolierung der n-Eikosansäure ausgewählten Fraktionen (s. S. 66) enthielten laut Gaschromatogramm neben dem gesättigten Vertreter noch beträchtliche Mengen ungesättigter Fettsäureester (Monoen-Tetraen) gleicher Kettenlänge. Es mußte demnach möglich sein, aus den Eluten 2 - 5 des zur Isolierung der n-Eikosansäure durchgeführten Trennungsganges (s. S. 66) sowohl Eikosensäure wie auch die niederen Sättigungsgrade zu gewinnen.

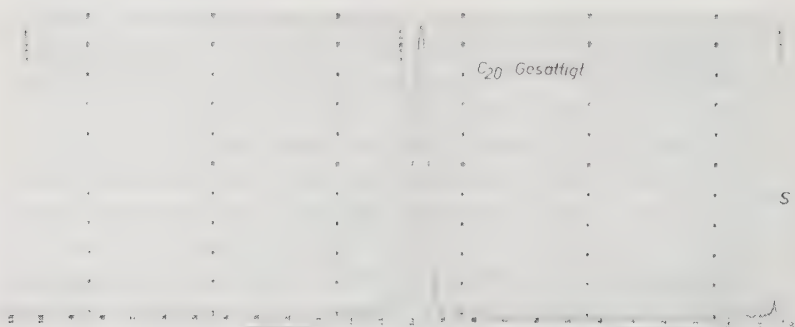


Abbildung 17

Gaschromatogramm von n-Eikosensäuremethylester
aus menschlicher Fettleber
(Trennbedingungen s. S. 26;
polare Trennphase)

Die Quecksilberaddukte der Monoene mit Kettenlängen von C_{14} - C_{18} ließen sich erfahrungsgemäß erst mit reinem Äther vom Kieselgel desorbieren. Es fiel daher auf, als das Addukt des Eikosensäureesters bereits mit dem Übergangslaufmittel Benzol/Äther^{*)} (Elut 2) in beträchtlicher Menge (150 mg) im Elut erschien. Der Rest wurde dann mit reinem Äther (Elut 3) von der Säule abgelöst. Beide Fraktionen wurden vereinigt, die Addukte zersetzt und auf die Ester hin aufgearbeitet. Auf diese Weise waren 200 mg von sehr reinem Eikosensäuremethylester angefallen, der nur noch geringe Verunreinigungen enthielt. Um diese restlos zu entfernen, verwandelte man nochmals in die Addukte und trennte jetzt an einer Säule mit 6 g Kieselgel. Ein Vorlauf von 3 SV Benzol, der im wesentlichen die Verunreinigungen enthielt, wurde verworfen. Mit 3 SV Essigester/

*) Der Grund für diese Erscheinung dürfte wohl in der größeren Löslichkeit einer so langen, einfach-ungesättigten Kohlenstoffkette in Lipoidlösungsmitteln zu suchen sein.

Eisessig (95 : 5) konnte das Addukt des Eikosensäureesters wieder zurückgewonnen werden. Dann zersetzte man die Addukte, entfernte eventuell vorhandene unverseifbare Bestandteile und regenerierte die Methylester. Auf diese Weise fielen 150 mg sehr reinen Eikosensäuremethylesters an, die Verunreinigungen jetzt nur noch in Spuren enthielten (siehe Abbildung 18).

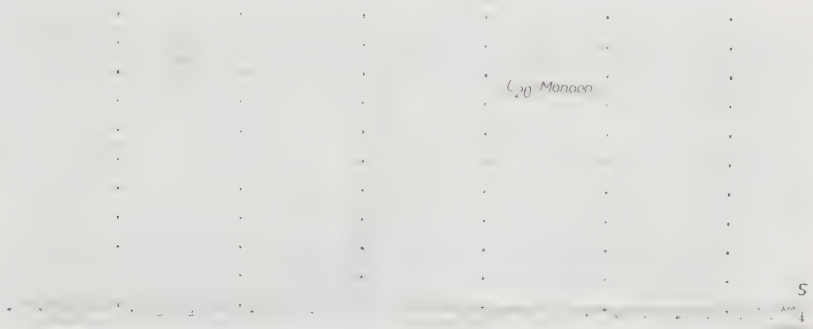


Abbildung 18

Gaschromatogramm von Eikosensäuremethylester
aus menschlicher Fettleber
(Trennbedingungen s. S. 26; polare Trennphase)

Als Produkt der katalytischen Hydrierung erhielt man daraus reinen Eikosensäureester. Als Jodzahl wurde 78,0 gefunden (theoretischer Wert 78,2). Für den Brechungsindex ermittelte man 1,4553 (Literaturwert für $n_D^{20} = 1,4545$). Der Gehalt an Dien- bzw. Trien-Konjugen in der nicht isomerisierten reinen Substanz betrug 0,9 bzw. 0,3 %. Aus der Absorptionsbande des IR-Spektrums bei $10,36 \mu$ (s. Abbildung 31) wurde ein Gehalt von 14 % an trans-Isomeren errechnet. Bei diesen trans-Isomeren dürfte es sich jedoch wohl wieder um Artefakte gehandelt haben. Damit konnte die erste ungesättigte Fettsäure der Kettenlänge C_{20} in Form von reinem Eikosensäuremethylester erhalten werden, der ursprünglich sehr wahrscheinlich frei von trans-Isomeren vorgelegen hatte.

b) Oxydative Spaltung des Eikosensäuremethylesters

Um die Lage der Doppelbindung im Eikosensäureester zu fixieren, löste man 13,2 mg C_{20} -Monoen in 10 ml wässrigem tert.-Butanol und oxydierte nach v. RUDLOFF mit einer Mischung von 84 mg $NaJO_4$, 2 mg $KMnO_4$ und 20 mg K_2CO_3 in 15 ml Wasser. Nach Aufarbeitung der Spaltprodukte fielen 10 Spaltsäuren an, die in Form ihrer Mono- bzw. Dimethylester auf verschiedenen Säulen gaschromatographisch identifiziert werden konnten:

Monocarbonsäuren	M_7 ,	M_8 ,	M_9 ,	M_{10} ,	M_{11}
Dicarbonsäuren	D_9 ,	D_{10} ,	D_{11} ,	D_{12} ,	D_{13} .

Zu einer Kettenlänge von 20 C-Atomen ließen sich davon kombinieren:

$$D_9 - M_{11} ; D_{10} - M_{10} ; D_{11} - M_9 ; D_{12} - M_8 \text{ und } D_{13} - M_7.$$

Zur quantitativen Auswertung wurden wieder nur die Flächen der schwerer flüchtigen Dicarbonsäuren $D_9 - D_{13}$ herangezogen. Unter Berücksichtigung der relativen Peakflächen der einzelnen Spaltsäuren bestand der oben isolierte Eikosensäureester aus einem Gemisch Stellungsisomere mit folgender Zusammensetzung:

$\Delta 9$,	$\Delta 10$,	$\Delta 11$,	$\Delta 12$,	$\Delta 13$.
6 %	2 %	78 %	1 %	13 %

Von den fünf identifizierten Stellungsisomeren der Eikosensäure machte das $\Delta 11$ -Isomere als Vertreter vom Ölsäuretyp mit 78 % den Hauptanteil im Gemisch aus. Aber auch der Palmitoleinsäuretyp war mit 13 % ($\Delta 13$ - Eikosensäure) hier noch recht stark vertreten. $\Delta 10$ - bzw. $\Delta 12$ -Eikosensäure lassen sich keiner der bekannten Fettsäurereihen zuordnen. Sie sind möglicherweise Kunstprodukte und durch Überoxydation bei der Spaltung nach v. RUDLOFF entstanden (s. S. 107).

△ 9-Eikosensäure könnte dagegen pflanzlichen Ursprungs und mit der Nahrung aufgenommen worden sein. Diese Stellung läßt sich ebenfalls nicht der Klenkschen Systematik der ungesättigten Fettsäuren einordnen. Eventuell handelt es sich hier aber auch um eine über den Acetatpool de novo aufgebaute Säure mit spezifischer Dehydrierung zwischen dem 9. und 10. Kohlenstoffatom. Diese Stellung ist für die tierische und pflanzliche Zelle offenbar recht leicht zugänglich (10, 38, 46).

4. Eikosadiensäuremethylester

a) Gewinnung

Als Ausgangsfraction zur Gewinnung von Eikosadiensäureester wurde das Essigester/Eisessig-Elut der Addukttrennung gewählt, die zur Isolierung reiner Eikosan- bzw. Eikosensäure geführt hatte (s. S.66; Elut 4). Nach Entfernen des Lösungsmittels zersetzte man die zurückbleibenden Addukte. Dabei konnte eine Fraction gewonnen werden, die neben dem Hauptbestandteil C_{20} -Dien noch merkliche Verunreinigungen an Nachbarkettenlängen aufwies, so daß erneut in die Addukte verwandelt werden mußte. Auf einer Säule mit 1 g Kieselgel adsorbierte man die entstandenen Quecksilberverbindungen, wusch dann mit jeweils 2 SV Benzol und Äther nach und konnte das gewünschte C_{20} -Dien schließlich mit Methanol/Eisessig (95 : 5) wieder vollständig eluieren. Nach Aufarbeitung und Zersetzung der Addukte fielen 22,0 mg Eikosadiensäuremethylester der Jodzahl 155,2 an (theoretische Jodzahl 157,4). Die gaschromatographische Analyse (s. Abbildung 19, Spitze a und b) zeigte zwar immer noch geringe Verunreinigungen, vor allem durch die Spitze c = C_{18} -Dien, an. In Anbetracht der geringen Menge, in der das gewonnene Präparat zur Verfügung stand, schien es jedoch sinnvoll, auf eine weitere Reinigung zu verzichten. Aus dem gleichen Grund mußte auch die Bestimmung des Brechungsindex unterbleiben.

Die katalytische Hydrierung des isolierten Präparates führte zu n-Eikosansäure, die mit etwa 8 % Oktadekansäure verunreinigt war. Aus dem IR-Spektrum (s. Abbildung 32) errechnete sich ein hoher Gehalt (30 %) an trans-Isomeren. Er dürfte auch beim C_{20} -Dien wieder durch die vorangegangene thermische Belastung bei der destillativen Aufarbeitung entstanden sein. Im UV-Spektrum der mit Alkali isomerisierten Substanz (s. Abbildung 38) erkannte man die für cis-Dien-Konjuene^{*)} charakteristische Absorptionsbande bei 232 nm. Der Gehalt an Dien-Konjuen in der nicht isomerisierten Probe betrug 4,5 %, der an Trien-Konjuen 0,6 %. Damit war die isolierte Substanz als Eikosadiensäuremethylester identifiziert, der ursprünglich aller Wahrscheinlichkeit nach in der all-cis-Konfiguration vorgelegen hatte.



Abbildung 19

Gaschromatogramm von Eikosadiensäuremethylester aus menschlicher Fettleber

(Trennbedingungen s. S. 26;
polare Tennphase)

*) Gemeint ist die Absorptionsbande für das a l l - cis-Konjuen.

b) Oxydative Spaltung des Eikosadiensäuremethylesters

Nach den Ergebnissen der katalytischen Hydrierung, der Jodzahlbestimmung und der Absorptionsmessung im UV wurde die oben isolierte Substanz als Eikosadiensäuremethylester erkannt. Im Gaschromatogramm war neben einer Verunreinigung in Form von C_{18} -Dien (Spitze c der Abbildung 19) ein Hauptpeak mit geringer Auflösung in zwei Spitzen a und b vorhanden. Daneben konnte man im aufsteigenden Ast der Spitze a noch eine geringfügige Ausbuchtung erkennen. Da sämtliche bisher isolierten ungesättigten Fettsäuren nach den Ergebnissen der oxydativen Spaltung als zum Teil vielteilige Gemische Stellungsisomere charakterisiert werden konnten, lag es nahe, auch hier beim C_{20} -Dien ähnliche Verhältnisse zu vermuten. Möglicherweise konnten den Spitzen a und b wieder verschiedene Stellungsisomere zugeschrieben werden (siehe dazu auch die Verhältnisse beim C_{18} -Trien auf Seite 62). Um die Sachlage zu klären, wurden 10 mg C_{20} -Dien in 10 ml wässrigem tert.-Butanol mit einer Lösung von 120 mg $NaJO_4$, 2,5 mg $KMnO_4$ und 30 mg K_2CO_3 in 20 ml Wasser nach v. RUDLOFF oxydiert. Nach Überführung in die Mono- bzw. Dimethylester konnten folgende Spaltsäuren gaschromatographisch festgestellt werden:

Monocarbonsäuren	M_6 ,	M_7 ,	M_8 ,	M_9 ,	M_{10}
Dicarbonsäuren	D_7 ,	D_8 ,	D_9 ,	D_{10} ,	D_{11} .

Berücksichtigte man den Verlust von 3 C-Atomen, der bei der oxydativen Spaltung zweifach-ungesättigter Fettsäuren nach v. RUDLOFF auftritt, so ließen sich von den identifizierten Spaltsäuren nur miteinander kombinieren:

$$D_7 - M_{10} \quad D_8 - M_9 \quad D_9 - M_8 \quad D_{10} - M_7 \quad D_{11} - M_6.$$

Die quantitative Analyse ergab dann folgende Verteilung für das Isomerengemisch:

$\Delta 7,10$	$\Delta 8,11$	$\Delta 9,12$	$\Delta 10,13$	$\Delta 11,14$.
7 %	28 %	14 %	5 %	45 %

Damit war die Vermutung bestätigt, daß auch das isolierte C_{20} -Dien als Gemisch verschiedener Stellungsisomere vor-
gelegen hatte. Hauptvertreter in diesem Gemisch war das
 $\Delta 11,14$ -Isomere (Linolsäuretyp). Aber auch der Ölsäure-
typ war mit 28 % ($\Delta 8,11$ -Eikosadiensäure) mengenmäßig stark
vertreten. Interessant war die Anwesenheit einer Säure vom
Palmitoleinsäuretyp ($\Delta 10,13$ - C_{20} -Dien). Es könnte durch
zweimalige Kettenverlängerung und Dehydrierung (über $\Delta 13$ -
Eikosensäure) aus $\Delta 9$ -Hexadecensäure entstanden sein.
 $\Delta 7,10$ - C_{20} -Dien und $\Delta 9,12$ - C_{20} -Dien lassen sich keiner
der bekannten Reihen zuordnen. $\Delta 9,12$ -Eikosadiensäure könn-
te wieder pflanzlichen Ursprungs und mit der Nahrung aufge-
nommen worden sein (s. auch S. 71).

Schwieriger als beim C_{18} -Trien, wo es galt, zwei Stellungs-
isomere zwei Spitzen im Gaschromatogramm zuzuordnen, gestal-
tet sich die Verteilung der fünf identifizierten isomeren
 C_{20} -Diene auf die beiden Spitzen des Gaschromatogramms der
Abbildung 19. Verschiebt sich eine Doppelbindung innerhalb
der Kohlenstoffkette ungesättigter Fettsäuren in Richtung
auf das Methylen, so wird dieses Molekül auf polaren gas-
chromatographischen Trennsäulen stärker festgehalten als
ein Molekül, bei dem sich die Doppelbindung mehr in der
Mitte der Kohlenstoffkette befindet (s. S. 99). Man könnte
deshalb die Spitze b der Abbildung 19 dem $\Delta 10,13$ - und
 $\Delta 11,14$ -Isomeren zuschreiben. Für die anderen Isomeren
($\Delta 7,10$; $\Delta 8,11$; $\Delta 9,12$) hätte man dann die Spitze a zur
Verfügung. Zusätzlich könnte das $\Delta 7,10$ -Isomere noch für
die Ausbuchtung im aufsteigenden Ast der Spitze a verant-
wortlich gemacht werden.

Die hier angedeutete Möglichkeit der Zuordnung einzelner
stellungsisomere ungesättigter Fettsäuren zu verschiede-
nen Spitzen eines Gaschromatogramms wird allerdings noch

wesentlich unsicherer, wenn (wie hier beim C_{20} -Dien) neben Stellungsisomeren zusätzlich noch geometrische Isomere anwesend sind. Aus dem IR-Spektrum des Eikosadiensäureesters konnte ein Gehalt von ca. 30 % an trans-Isomeren errechnet werden. Da es sich bei diesen trans-Isomeren wahrscheinlich um Kunstprodukte handelte, liegen möglicherweise auch nicht alle Doppelbindungen der Kohlenstoffkette in der trans-Form vor. Die Isomerisierung von Doppelbindungen mit ursprünglich vorhandener all-cis-Konfiguration wird sicherlich schrittweise erfolgen und nicht immer gleich alle Doppelbindungen erfassen. So könnten nebeneinander also all-cis-, cis-trans-, trans-cis- und vielleicht auch all-trans-Isomere vorliegen. Solche Isomerisierungen können wiederum zu Änderungen in den Retentionszeiten der einzelnen Individuen Anlaß geben.

Aus diesen Gründen wird die Zuordnung einer größeren Zahl von Stellungsisomeren und geometrischen Isomeren zu verschiedenen Peaks eines Gaschromatogramms recht problematisch bleiben. Sie konnte deshalb auch für den Eikosadiensäureester in der oben vorgeschlagenen Form nicht mit größer Sicherheit erfolgen.

5. Eikosatriensäuremethylester

a) Gewinnung

Die Trennung der einzelnen Sättigungsgrade (Monoen bis Trien) konnte bisher mit Hilfe spezifischer Laufmittel aufgrund unterschiedlicher Haftfestigkeiten der Quecksilberacetataddukte an Kieselgel erfolgreich durchgeführt werden. Die Unterschiede in der Haftfestigkeit der Addukte gegenüber dem Kieselgel nehmen jedoch vom Monoen zum Trien deutlich ab. Sie sind zwischen Trien und Tetraen nur noch sehr gering.

Zur Gewinnung von reinem Eikosatriensäuremethylester mußte dieser von begleitendem Eikosatetraensäureester abgetrennt werden. Eikosatetraensäuremethylester sollte dabei gleichfalls in reiner Form isoliert werden. Es war damit das Problem der Trennung C_{20} -Trien/ C_{20} -Tetraen gegeben. R. Hofmann (25) hatte bei der Trennung Trien/Tetraen der Kettenlänge C_{20} mit der doppelten Menge Kieselgel und einem spezifisch abgestuften Laufmittel aus 85 % Essigester, 10 % Methanol und 5 % Eisessig gute Ergebnisse vorlegen können. Diese Erkenntnisse sollten bei der folgenden Trennung Verwendung finden.

Im Methanol/Eisessig-Elut (Elut 5) des zur Isolierung reiner n-Eikosansäure durchgeführten Trennungsganges (s. S. 66) standen 705 mg einer geeigneten Trien/Tetraen-Fraktion (Jodzahl 290) zur Verfügung. Nachbarkettenlängen sowie niedere bzw. höhere Sättigungsgrade waren nicht mehr zugegen. Mit 5 g Quecksilberacetat in 125 ml Methanol wurde die Fraktion in die Addukte überführt. Nach Aufarbeitung gab man die Addukte, in Benzol gelöst, auf eine Säule mit 140 g Kieselgel. Zunächst wurde mit 2 SV Benzol, dann mit 3 SV Essigester/Eisessig (95 : 5) gewaschen. Mit 2,8 SV Essigester/Methanol/Eisessig (85 : 10 : 5) begann man dann den eigentlichen chromatographischen Trennungsgang:

Das abtropfende Elut wurde dazu mit Hilfe eines Fraktionsammlers in Portionen zu jeweils 25 ml aufgeteilt. Um den Trennungsgang verfolgen zu können, gab man 0,02 ml der gerade abgetropften Fraktion in 10 ml Benzol p. a., das 10 Tropfen 0,1%ige methanolische Diphenylcarbazonlösung enthielt. Nach 2 Minuten war die größte Farbintensität erreicht, so daß in einem Kolorimeter die relative Farbtiefe gegen eine Standardprobe gemessen werden konnte. Als Standardprobe diente dabei die Fraktion, in der zum erstenmal deutlich Quecksilber nachweisbar war. Auf diese Weise wurde das Essigester/Methanol/Eisessig-Elut in 34 Fraktionen unterteilt, von denen die Fraktionen 10 - 24, 25 - 30 und 31 - 34 jeweils vereinigt wurden. Die Fraktionen 1 - 9 zeigten praktisch

noch keine Quecksilberreaktion und konnten daher verworfen werden. Beim Austreten der 25. Fraktion gab man 1 SV Methanol/Eisessig (95 : 5) oben auf die Säule. Die mit diesem Laufmittel eluierten Addukte wurden in den Fraktionen 35-40 aufgefangen. Aus den vereinigten Fraktionen 10-24 konnten nach Aufarbeitung zu den Methylestern 210 mg eines gleichteiligen Gemisches von C_{20} -Trien und C_{20} -Tetraen isoliert werden. Zur weiteren Anreicherung des Triens setzte man diese Fraktion mit 1,5 g Quecksilberacetat und 37,5 ml Methanol zu den Addukten um und chromatographierte nun an einer Säule mit 1,4 g Kieselgel nach dem Verdrängungsverfahren. Mit 1 SV Benzol konnte man zunächst 46 mg an reinem Eikosatriensäureester isolieren. Mit einem weiteren SV Benzol fiel eine Übergangsfraction, bestehend aus Trien- und Tetraenaddukten an, die nicht weiter aufgearbeitet wurde. Mit Methanol/Eisessig (1 SV) konnten dann die restlichen Addukte wieder vollständig vom Kieselgel desorbiert werden. Nach Aufarbeitung fielen daraus 109 mg reines C_{20} -Tetraen an. Aus den Fraktionen 35-40 wurden weitere 78 mg C_{20} -Tetraen erhalten, so daß damit insgesamt 187 mg Eikosatetraensäuremethylester zur Verfügung standen (zur weiteren Verarbeitung dieses Präparates s. S. 80).

Der oben isolierte Eikosatriensäureester erwies sich als gaschromatographisch praktisch reine Substanz (s. Abbildung 20). Als Verunreinigung war nur etwas C_{20} -Tetraen (Spitze c der Abbildung 20) enthalten. Als Jodzahl wurde 206,9 gefunden (theoretischer Wert 237,6). Für den Brechungsindex konnte ein Wert von $n_D^{20} = 1,4723$ ermittelt werden (Literaturwert = 1,4730). Als Hydrierungsprodukt wurde reiner n-Eikosansäuremethylester erhalten. Im UV-Spektrum des mit Alkalihydroxid isomerisierten C_{20} -Triens (s. Abbildung 39) waren die für cis-Trien-Konjuene charakteristischen Absorptionsbanden bei 258, 268 und 279 nm vorhanden. Tetraen-Konjuene (Verunreinigung) waren andeutungsweise zu erkennen. Der Gehalt an Dien-Konjuen in der nicht isomerisierten Probe betrug 2,8 %, der an Trien-Konjuen 0,7%.

*) Gemeint sind die Absorptionsbanden für die a l l - cis-Konjuene.

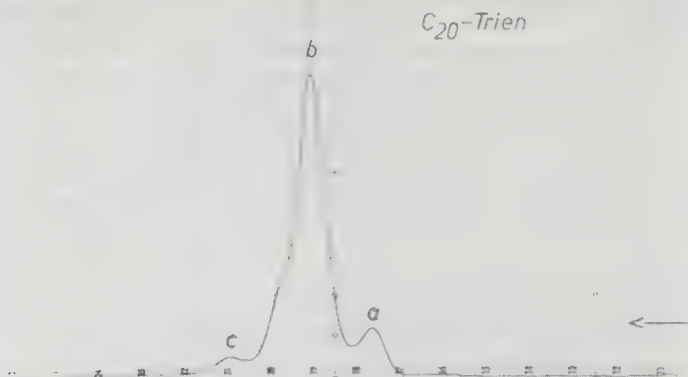


Abbildung 20

Gaschromatogramm von Eikosatriensäuremethyl-
ester aus menschlicher Fettleber
(Trennbedingungen s. S. 26;
polare Trennphase)

Aus dem IR-Spektrum (s. Abbildung 33) wurde ein Gehalt von 10,3 % an trans-Isomeren errechnet. Damit konnte die isolierte Verbindung als gaschromatographisch praktisch reiner Eikosatriensäuremethylester identifiziert werden, der ursprünglich in der all-cis-Konfiguration vorgelegen haben dürfte.

b) Oxydative Spaltung des Eikosatriensäuremethylesters

Zur Feststellung der Lage der Doppelbindungen wurden 16,2 mg C_{20} -Trien in 30 ml wässrigem tert.-Butanol gelöst und nach v. RUDLOFF mit einem Oxydationsmittelgemisch, bestehend aus 300 mg $NaJO_4$, 6 mg $KMnO_4$ und 50 mg K_2CO_3 in 50 ml Wasser, gespalten. Als Spaltsäuren wurden in Form ihrer Mono- bzw. Dimethylester identifiziert:

Monocarbonsäuren	M ₃ ,	M ₅ ,	M ₆ ,	M ₉
Dicarbonsäuren	D ₅ ,	D ₈ ,	D ₉ ,	D ₁₁ .

Berücksichtigt man den Verlust von 6 C-Atomen, der bei der oxydativen Spaltung eines Triens nach v. RUDLOFF entsteht, so konnten die oben entstandenen Spaltsäuren nur folgendermaßen kombiniert werden:

$$D_{11} - M_3 \quad D_9 - M_5 \quad D_8 - M_6 \quad D_5 - M_9.$$

Der Eikosatriensäuremethylester bestand also wie alle anderen bisher isolierten ungesättigten Fettsäureester gleichfalls aus einem Gemisch von Stellungsisomeren. Die quantitative Analyse führte dann zu folgender Verteilung:

Δ 5,8,11	Δ 8,11,14	Δ 9,12,15	Δ 11,14,17.
8 %	79 %	4 %	9 %

Δ 8,11,14-Eikosatriensäuremethylester war als Hauptvertreter vom Linolsäuretyp. Es folgte ein Vertreter vom Linolensäuretyp mit 9 % (Δ 11,14,17-C₂₀-Trien). In fast gleicher Konzentration war aber auch der Ölsäuretyp durch das Δ 5,8,11-C₂₀-Trien vertreten. Δ 9,12,15-Eikosatriensäuremethylester könnte prinzipiell vom Myristoleinsäuretyp Δ (ω - 5) sein. Das ist allerdings recht unwahrscheinlich, da Vertreter dieses Typs bisher nur sehr spärlich und ausnahmslos bei der Untersuchung ungesättigter Fettsäuren mit bis zu 16 Kohlenstoffatomen in der Kette aufgefunden wurden. Wahrscheinlicher dürfte es sein, daß diese Säure durch Dehydrierung aus Δ 9,12-Eikosadiensäure hervorgegangen ist, die ihrerseits keiner dieser Fettsäurereihen zugeordnet werden kann. Damit wäre dann aber auch zugleich ihre Herkunft aus dem Pflanzenreich erwiesen, da nur die pflanzliche Zelle die Fähigkeit besitzt, in bereits ungesättigte Fettsäuren weitere in Richtung auf das Methylende der Kohlenstoffkette einzubauen (39).*)

*) Siehe dazu auch auf Seite 115.

Die Zuordnung der vier vorhandenen Stellungsisomeren zu den beiden Spitzen a und b des Gaschromatogramms (Abbildung 20) bereitet die gleichen Schwierigkeiten, die beim C_{20} -Dien diskutiert wurden. Dem $\Delta 5,8,11$ -Isomeren könnte die Spitze a zugeschrieben werden. Der Hauptvertreter ($\Delta 8,11,14$ - C_{20} -Trien) liegt wahrscheinlich zusammen mit dem $\Delta 9,12,15$ -Isomeren unter der Spitze b. Dann bliebe für den $\Delta 11,14,17$ -Eikosatriensäureester die an der abfallenden Flanke der Spitze b deutlich zu erkennende Schulter übrig. Die Anwesenheit von trans-Isomeren (es wurde ein Gehalt von 10,3 % ermittelt) kompliziert das Bild sehr wesentlich. Sie sind bei dieser Verteilung der Stellungsisomeren deshalb unberücksichtigt geblieben.

6. Eikosatetraensäuremethylester

a) Gewinnung

Bei der Isolierung des Eikosatriensäureesters waren 187 mg einer Fraktion angefallen, von der vermutet wurde, daß es sich um ein C_{20} -Tetraen handelte. Im Gaschromatogramm (s. Abbildung 21) zeichnete sich das Präparat durch die beiden Spitzen a und b aus. Als Jodzahl konnte ein Wert von 308,4 ermittelt werden (theoretischer Wert für C_{20} -Tetraen 318,8). Der Brechungsindex des Präparates betrug 1,4792 (Literaturwert: $n_D^{20} = 1,4816$). Die katalytische Hydrierung führte zu gaschromatographisch reinem Eikosensäuremethylester. Im UV-Spektrum der mit Alkali isomerisierten Substanz (s. Abbildung 40) waren die für cis-Tetraen-Konjuene typischen Absorptionsbanden bei 301 und 315 nm vorhanden. Niedere Sättigungsgrade waren nicht anwesend. Der Gehalt an Dien-Konjuen (Trien-Konjuen) der nicht isomerisierten Substanz betrug 4,2 % (1,4 %). Aus dem IR-Spektrum (s. Abbildung 34) konnte ein Gehalt von 27,5 % an trans-Isomeren errechnet werden. Die isolierte Substanz konnte damit als reiner Eikosatetraensäuremethylester identifiziert werden.

*) Siehe dazu auch S. 77.

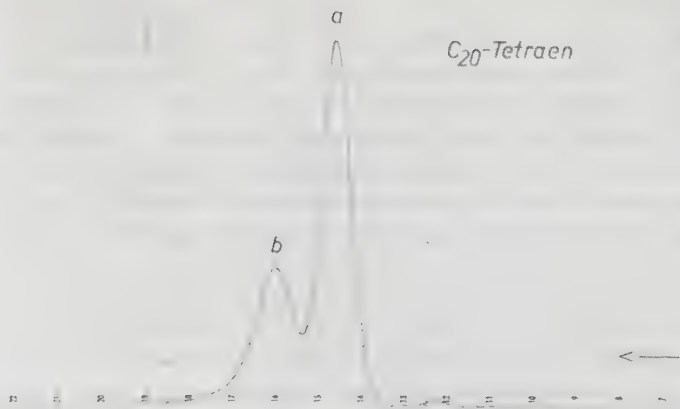


Abbildung 21

Gaschromatogramm von Eikosatetraensäuremethylester aus menschlicher Fettleber
(Trennbedingungen s. S. 26;
polare Trennphase)

Der hohe Gehalt an trans-Isomeren schloß nicht aus, daß das Tetraen ursprünglich in der all-cis-Konfiguration vorgelegen hatte und die teilweise Isomerisierung erst später während der Aufarbeitung durch thermische Einflüsse zustande gekommen war. Um zu entscheiden, ob beide Spitzen des Gaschromatogramms der Abbildung 21 stellungsisomeren Tetraenen zuzuschreiben waren, wurde eine oxydative Spaltung des reinen Eikosatetraensäuremethylesters nach v. RUDLOFF durchgeführt.

b) Oxydative Spaltung des Eikosatetraensäuremethylesters

22,0 mg C_{20} -Tetraen wurden zur oxydativen Spaltung in 30 ml wässrigem tert.-Butanol gelöst. Als Oxydationsgemisch diente eine Lösung von 440 mg $NaJO_4$, 10 mg $KMnO_4$ und 240 mg K_2CO_3 in 50 ml Wasser. Nach entsprechender Reaktionszeit wurde in gewohnter Weise auf die Spaltester hin aufgearbeitet. Gaschromatographisch konnten nur 2 Spaltsäuren in Form ihrer Ester identifiziert werden:

Monocarbonsäure-6 und Dicarbonsäure-5.

Oxydiert man ein Mol einer vierfach-ungesättigten Fettsäure, so entstehen drei Mole Malonsäure, die hier wiederum nicht faßbar waren. Kombinierte man die entstandenen Spaltprodukte miteinander, so mußte sich eine Differenz von 9 C-Atomen gegenüber der ursprünglich vorhandenen Kohlenstoffkette ergeben. Danach hatte das isolierte Präparat vor der oxydativen Spaltung als reiner

Δ 5,8,11,14-Eikosatetraensäuremethylester

vom Linolsäuretyp vorgelegen. Andere Stellungsisomere waren nicht anwesend. Aus dem IR-Spektrum hatte man einen Gehalt von 27,5 % an trans-Isomeren ermittelt. Zu der gleichen Zahl kam man andererseits nach Auswertung des Flächeninhaltes der Spitze b des Gaschromatogramms der Abbildung 21. Die Spitze b konnte danach mit großer Sicherheit dem trans-Isomeren zugesprochen werden, während das all-cis-Isomere als Hauptvertreter mit ca. 70 % zur Spitze a gehörte.

H. Dokosasäuren

1. n-Dokosansäure

Da Heneikosasäuren erwartungsgemäß im Fett der menschlichen Fettleber fehlten, galt das weitere Interesse zunächst der Kettenlänge C_{22} . Zur Isolierung von Vertretern dieser Kettenlänge standen die vereinigten Rückstände der einzelnen Hauptdestillationen zur Verfügung. Das Ausgangsprodukt (4,2 g) war gefärbt und sollte zur Entfernung polymerer Anteile einer Kugelrohrdestillation unterworfen werden. Bei einem Druck von 10^{-4} Torr und Temperaturen zwischen 110 und 128 °C fielen 1,8 g eines grüngelben, leichtbeweglichen Öles (Jodzahl 210) an, das nach gaschromatographischer Analyse neben n-Dokosansäureester (8,5 %) und n-Tetradokosansäureester (9,0 %) als Hauptbestandteil 38 % Dokosahexaensäureester enthielt.

Zunächst sollte jedoch die n-Dokosansäure in reiner Form abgetrennt werden. Dazu löste man das gesamte Destillat der Kurzwegdestillation (1,8 g) zusammen mit 9,5 g Quecksilber(II)-acetat in 250 ml Methanol und verwandelte in die Addukte. Um den in dieser Fraktion in erheblicher Menge vorhandenen, relativ temperatur- und luftempfindlichen Dokosahexaensäuremethylester möglichst schonend und schnell mitzugewinnen zu können, wurde das Verfahren der Verdrängungs-chromatographie gewählt, und die benzolische Adduktlösung (200 ml) auf eine Trennsäule mit 7,5 g Kieselgel aufgebracht. Dann gab man 2 SV Benzol als Waschflüssigkeit durch die Säule und fing das abtropfende Elut zur Isolierung der darin enthaltenen gesättigten Säuren der Kettenlänge C_{22} und C_{24} auf.

Zunächst desorbierte man jedoch noch mit 2,5 SV Methanol/Eisessig (95 : 5) die auf der Trennsäule haftenden Addukte des wertvollen Dokosahexaensäuremethylesters, deren weitere Verarbeitung auf Seite 88 beschrieben wird.

Zur Gewinnung von n-Dokosan- und n-Tetrakosansäure entfernte man das Lösungsmittel der oben aufgefangenen Benzolelute, zersetzte die dabei anfallenden Addukte mit Ammoniumrhodanid und Salzsäure und arbeitete auf die freien Säuren hin auf. Dabei fielen 200 mg an Fettsäuren an, die zur Isolierung der beiden gewünschten Säuren in der 15-fachen Menge Aceton gelöst und einer Tieftemperaturkristallisation unterworfen wurden. Das bei -30°C ausfallende Kristallisat (75 mg) wurde abgetrennt. Es bestand zur Hauptsache aus den gesuchten Säuren und sollte zur Trennung beider Individuen voneinander der Destillation im Horizontalrohr unterworfen werden. Insgesamt führte man 3 Rohrdestillationen mit je 25 mg Substanzgemisch im Wasserstoffstrom bei 1,5 Torr durch. Man destillierte dabei in einem Glasrohr von 4,5 mm lichter Weite bei Temperaturen zwischen 220 und 180°C . Bei der ersten Destillation wurden 28, bei der zweiten 18 und bei der dritten schließlich 24 Fraktionen erhalten. Die ersten sechs höchstschmelzenden Fraktionen jeder Destillation wurden zusammengetrieben und vereinigt. Sie enthielten ausschließlich Säuren der Kettenlänge C_{24} . Ihre weitere Aufarbeitung wird auf Seite 91 beschrieben. Zur Isolierung reiner n-Dokosansäure wurden die Fraktionen 16 - 22 (1. Destillation), 11 - 14 (2. Destillation) und 11 - 19 (3. Destillation) vereinigt und einer neuen Rohrdestillation unterworfen. Hierbei konnten 15 Fraktionen erhalten werden, von denen die 3. bis 12. gesammelt und einer exakten Schmelzpunktbestimmung unterzogen wurden. Dabei wurden folgende Schmelzpunkte ermittelt:

n-Dokosansäure, isoliert	$79,3^{\circ}\text{C}$
n-Dokosansäure, rein	$79,9^{\circ}\text{C}$
Mischschmelzpunkt	$79,4^{\circ}\text{C}$.

Es wurde zwar noch versucht, den Schmelzpunkt der Substanz durch eine zusätzliche Destillation weiter anzuheben, doch blieb das erfolglos. Die gaschromatographische Analyse (s. Abbildung 22) zeigte dann auch eine Verunreinigung am

C₂₂-Gesättigt

Abbildung 22

Gaschromatogramm von n-Dokosansäuremethylester aus menschlicher Fettleber
(Trennbedingungen s. S. 26; polare Trennphase)

Auslauf des Hauptpeaks. Wahrscheinlich handelte es sich dabei um etwas C₂₂-Monoen, das nur schwer durch Rohrdestillation zu entfernen war.

Damit hatte man auch die n-Dokosansäure im menschlichen Leberfett nachweisen und in fast reiner Form vorlegen können.

2. Dokosapentaensäuremethylester

Ein- bis vierfach-ungesättigte Fettsäuren der Kettenlänge C₂₂ waren im menschlichen Leberfett in viel zu geringer Menge anwesend, als daß eine Anreicherung dieser Sättigungsgrade hätte erfolgreich durchgeführt werden können. Bei der Abtrennung des Dokosahexaensäureesters von begleitenden Verunreinigungen

mit Hilfe von Quecksilberaddukten (s. Seite 88) konnten aus dem Essigester/Methanol/Eisessig-Elut des dort durchgeführten chromatographischen Trennungsganges schließlich 130 mg einer Fraktion erhalten werden. Sie bestand gaschromatographisch zu 90 % aus Dokosahexaensäureester und enthielt daneben noch zu etwa 10 % eine zweite Substanz. Diese Substanz erschien im Gaschromatogramm kurz vor der Hauptkomponente, besaß also eine etwas kürzere Retentionszeit als diese. Da die Retentionszeit für ein C_{22} -Tetraen zu groß war, wurde vermutet, daß es sich bei der begleitenden Verbindung um ein C_{22} -Pentaen handelte. Für eine Isolierung war die zur Verfügung stehende Menge jedoch viel zu gering, so daß eine Identifizierung der fraglichen Verbindung nur aus dem zur Verfügung stehenden Gemisch zusammen mit Dokosahexaensäureester vorgenommen werden konnte. Die katalytische Hydrierung des Gemisches führte zu reinem Dokosansäuremethylester. Damit war die Kettenlänge C_{22} sichergestellt. Aus dem UV-Spektrum und der Jodzahlbestimmung (405,8) konnten wegen des vorherrschenden Hexaens keine Schlüsse auf eine fünffach-ungesättigte Fettsäure abgeleitet werden.

So blieb nur übrig, aus den Spaltprodukten der Oxydation nach v. RUDLOFF die Endstücke der ursprünglich vorhandenen Kohlenstoffkette zu ermitteln und danach die Lage der Doppelbindungen festzulegen. 50 mg des Gemisches, in dem die fragliche Verbindung zu 10 % neben 90 % Dokosahexaensäuremethylester vorlag, wurden in 120 ml wässrigem tert.-Butanol gelöst und langsam in ein Oxydationsmittelgemisch, bestehend aus 2,0 g $NaJO_4$, 1,0 g K_2CO_3 und 48 mg $KMnO_4$ in 300 ml Wasser, eingetropft. Nach Aufarbeitung überführte man in die zugehörigen Methylester und chromatographierte anschließend auf polaren und unpolaren Trennsäulen bei verschiedenen Arbeitstemperaturen. Dabei konnten folgende Spaltsäuren identifiziert werden:

Monocarbonsäure-3

Dicarbonsäure-4

Dicarbonsäure-7.

Propionsäure (M_3) und Bernsteinsäure (D_4) waren als einzige Spaltsäuren des Dokosahexaensäuremethylesters (s. Seite 90) bereits identifiziert. Pimelinsäure (D_7) war in sehr viel geringerer Konzentration als Bernsteinsäure anwesend. Sie mußte notwendigerweise dem Carboxylende der gesuchten Säure entstammen, d. h., die erste Doppelbindung mußte demnach in $\Delta 7$ liegen. Da als Monocarbonsäure nur Propionsäure festgestellt wurde, mußte diese sowohl aus dem bereits bekannten Hexaen, wie auch aus der gesuchten Substanz als Gegenstück zur Pimelinsäure bei der oxydativen Spaltung entstanden sein. Zwischen Dicarbonsäure-7 und Monocarbonsäure-3 ließen sich innerhalb einer Kohlenstoffkette von 22 C-Atomen maximal 5 Doppelbindungen im Divinylnmethanrhythmus anordnen. Damit dürfte es sich bei der gesuchten Substanz aller Wahrscheinlichkeit nach um den Methylester der

$\Delta 7, 10, 13, 16, 19$ -Dokosapentaensäure *)

gehandelt haben. Ähnlich wie die Eikosatetraensäure (s. Seite 82) lag somit auch die Dokosapentaensäure nicht als Gemisch ~~Stellungs~~isomerer, sondern als Reinsubstanz im Fett der menschlichen Fettleber vor.

*) Nach der Lage der Doppelbindungen war die isolierte Dokosapentaensäure also vom Linolensäuretyp.

3. Dokosahexaensäuremethylester

a) Gewinnung

Bei der Abtrennung der gesättigten Säuren C_{22} und C_{24} hatte man den Rückstand der sechs Hauptdestillationen chromatographisch mit Hilfe der Quecksilberaddukte nach dem Verdrängungsverfahren aufgearbeitet (s. Seite 83). Dabei wurde die Kieselgelmenge so bemessen, daß nur die höchsten Addukte (Hexaen-Addukte) auf der Trennsäule festgehalten wurden. Mit 2,5 SV Methanol/Eisessig (95 : 5) konnten sie dann wieder vollständig vom Gel abgelöst werden. Nach Aufarbeitung und Zersetzung der Addukte lagen 500 mg an hochungesättigten Fettsäuremethylestern vor, die zur Hauptsache aus Dokosahexaensäureester bestanden. Daneben schien in geringer Menge Dokosapentaensäuremethylester anwesend zu sein. Als Verunreinigung waren ferner noch Monoene und Diene der Kettenlänge C_{18} , C_{20} und C_{22} vorhanden. Um zu reinem Hexaen zu kommen, war also eine zweite Addukttrennung erforderlich. 500 mg der Hexaen-Fraktion (Jodzahl 395) wurden mit 5 g Quecksilberacetat in 125 ml Methanol in die Addukte überführt. Dann trennte man an einer Säule mit 4 g Kieselgel wieder nach dem Verdrängungsverfahren. Mit 5 SV Benzol wurde zunächst gewaschen. Dann desorbierte man mit 2 SV Methanol/Eisessig alle auf der Säule haftenden Addukte. Die gaschromatographische Analyse zeigte den Erfolg der Trennung: Neben C_{22} -Hexaen und etwas C_{22} -Pentaen (zusammen 320 mg) waren andere Komponenten jetzt nicht mehr anwesend. Nun galt es noch, das begleitende Pentaen zu entfernen. Dazu wurde das gesamte Hexaen/Pentaen-Gemisch (320 mg) mit 3,5 g Quecksilberacetat in 90 ml Methanol gelöst und in die Addukte überführt. Nachdem man die Addukte in benzolischer Lösung auf einer Säule mit 85 g Kieselgel adsorbiert hatte

(Kieselgelmenge in g = $\frac{2 \cdot \text{Jodzahl} \cdot \text{g Ester}}{3}$) *), wurde der

*) Siehe dazu auch auf Seite 75.

Trennungsgang (Entwicklungsmethode!) mit 4 SV Essigester/Eisessig (95 : 5) begonnen. Die Quecksilberreaktion mit Diphenylcarbazon blieb dabei im Elut negativ. Mit 1,5 SV Essigester/Methanol/Eisessig (85 : 10 : 5) konnte dann die Hauptmenge der Addukte desorbiert werden. Der Rest ließ sich mit 3 SV Methanol/Eisessig (95 : 5) wieder von der Säule ablösen. Nach Zersetzung der Addukte regenerierte man die Methylester. Aus dem Essigester/Methanol/Eisessig-Elut konnten 130 mg gewonnen werden, die neben C₂₂-Hexaen das gesamte C₂₂-Pentaen (ca. 10 %) enthielten (s. Seite 85). Aus dem Methanol/Eisessig-Elut wurden dann 70 mg an reinem Dokosahexaensäuremethylester gewonnen (Spitze b und c der Abbildung 23), der Pentaen nur noch in Spuren enthielt (Spitze a). Die katalytische Hydrierung ergab reine n-Dokosansäure. Als Jodzahl wurde 424,9 bestimmt (theoretische Jodzahl 444,7). Der Brechungsindex des Präparates betrug 1,4966 (Literaturwert=1,4975). Aus dem IR-Spektrum (s. Abbildung 35) ergab sich ein Gehalt von 7 % an trans-Isomeren (Spitze c der Abbildung 23).

Abbildung 23

Gaschromatogramm von Dokosahexensäuremethyl-
ester aus menschlicher Fettleber
(Trennbedingungen s. Seite 26;
polare Trennphase)

Der Dokosahexaensäureester zeigte damit als höchstungs-sättigte Verbindung einen bemerkenswert geringen Anteil an trans-Isomeren. Das UV-Spektrum des mit Alkali isomerisierten Esters (s. Abbildung 41) wies die typischen Absorptionsbanden auf, die auf das Vorliegen von sechs konjugierten Doppelbindungen im Molekül schließen lassen (all-cis-Hexaen-Konjuene absorbieren im UV bei 333,352 und 374 nm). In der nicht isomerisierten Probe betrug der Gehalt an Dien-Konjueen 1,7 %, der an Trien-Konjueen 0,2 %. Danach handelte es sich bei der isolierten Verbindung um praktisch reinen all-cis-Dokosahexaensäuremethylester, der als höchstungs-sättigte Komponente im Fett der menschlichen Fettleber nachgewiesen werden konnte.

b) Oxydative Spaltung des Dokosahexaensäuremethylesters

Eine oxydative Spaltung des isolierten Dokosahexaensäuremethylesters sollte Aufschluß über die Lage der sechs Doppelbindungen im Molekül geben. 26,3 mg C_{22} -Hexaen wurden in 60 ml wässrigem tert.-Butanol gelöst und wie üblich mit einem Oxydationsmittelgemisch (1,0 g $NaJO_4$, 500 mg K_2CO_3 und 24 mg $KMnO_4$ in 150 ml Wasser) gespalten. Nach Aufarbeitung zu den Methylestern konnten als einzige Spaltsäuren

Monocarbonsäure-3 und Dicarbonsäure-4

identifiziert werden. Bei der oxydativen Spaltung nach E. v. RUDLOFF entstehen aus einem Mol eines Hexaens fünf Mole Malonsäure, die hier wiederum verloren gehen. Die Summe der C-Atome der entstandenen Spaltsäuren muß demnach um 15 Einheiten kleiner sein, als die Kohlenstoffkette vor der Oxydation besaß. So mußte das isolierte Hexaen als fastreiner

all-cis- Δ 4,7,10,13,16,19-Dokosahexaensäuremethylester

angesprochen werden. Der Dokosahexaensäureester war danach vom Linolensäuretyp. Andere Stellungsisomere waren nicht vorhanden.

I. Tetrakosasäuren

n-Tetrakosansäure

Da die Kettenlänge C_{23} erwartungsgemäß im menschlichen Leberfett fehlte, schloß sich an die Untersuchung der Dokosasäuren die der Tetrakosasäuren an. Es sei vorweggenommen, daß die Kettenlänge C_{24} nur durch n-Tetrakosan- und Tetrakosensäure vertreten war, wobei das Monoen in so geringer Menge vorkam, daß eine Isolierung aussichtslos erschien. Die Untersuchung der Tetrakosasäuren beschränkte sich damit auf die Isolierung von n-Tetrakosansäure.

Bei der Gewinnung von n-Dokosansäure (s. Seite 83) hatte man durch Horizontalrohrdestillation eine Reihe hochsiedender Fraktionen abgetrennt, die nach der Lage ihrer Schmelzpunkte aus Vertretern der Kettenlänge C_{24} zu bestehen schienen. Sie wurden deshalb vereinigt und einer neuen Rohrdestillation unterworfen. In einem Glasrohr von 4,5 mm lichter Weite destillierte man im Wasserstoffstrom bei 2 Torr und einem Wärmegefälle von 220 / 180 °C. Dabei wurden 20 Fraktionen erhalten. Die Fraktionen 2 - 7 (Fp.: 82,0 - 82,5 °C) wurden schließlich einer dritten Destillation, diesmal jedoch in einem Glasrohr mit einer lichten Weite von nur 2,5 mm unterzogen. Bei dieser Mikrodestillation fielen 12 Fraktionen an, von denen die Kernfraktionen 2 - 6 herausgeschnitten, vereinigt und auf ihren Schmelzpunkt untersucht wurden:

n-Tetrakosansäure, isoliert	83,1 °C
n-Tetrakosansäure, rein	84,3 °C
Mischschmelzpunkt	83,5 °C.

C₂₄ Gesättigt



Abbildung 24

Gaschromatogramm von n-Tetrakosansäure-
methylester aus menschlicher Fettleber
(Trennbedingungen s. Seite 26;
polare Trennphase)

Eine weitere Anhebung des Schmelzpunktes der n-Tetrakosansäure blieb wie im Fall der n-Dokosansäure erfolglos. Die gaschromatographische Analyse (s. Abbildung 24) lieferte schließlich die Erklärung für den relativ niedrigen Schmelzpunkt der isolierten Säure. Die Hauptmenge der Substanz (Spitze a der Abbildung 24) bestand aus n-Tetrakosansäure, die jedoch noch etwas Tetrakosensäure enthielt (Spitze b). Diese war durch Rohrdestillation nicht ganz zu entfernen. Wenn die n-Tetrakosansäure auch nicht mit der bei den niederen Homologen erzielten hohen Reinheit vorgelegt werden konnte, so darf der Nachweis dieser Säure im Fett der menschlichen Fettleber doch als gesichert angesehen werden.

Damit war das Ziel dieser Arbeit erreicht. Aus menschlichem Leberfett konnten zahlreiche normale gesättigte Fettsäuren mit 12 bis 24 Kohlenstoffatomen isoliert werden. Daneben gelang es, eine Vielzahl ungesättigter Säuren mit 1 bis 6 Doppelbindungen und 14 bis 22 Kohlenstoffatomen im Molekül in zum Teil hoher Reinheit vorzulegen (siehe dazu Tabelle 1 auf Seite 94). Längerkettige gesättigte Fettsäuren und niedere Sättigungsgrade konnten im Fett der menschlichen Fettleber nicht nachgewiesen werden. Bei den hier identifizierten gesättigten und ungesättigten Fettsäuren handelte es sich ausnahmslos um normale unverzweigte Komponenten.

J. Zusammenstellung der im Fett der menschlichen
Leber (Fettleber) nachgewiesenen Fettsäuren

Tabelle 1

Normale gesättigte Säuren

	Gew. - %
1. Dodekansäure	$2,9 \cdot 10^{-1}$
2. Tetradekansäure	2,2
3. Pentadekansäure	$6,9 \cdot 10^{-2}$
4. Hexadekansäure	28,1
5. Heptadekansäure	Spuren
6. Oktadekansäure	6,9
7. Eikosansäure	$1,3 \cdot 10^{-1}$
8. Dokosansäure	$2,6 \cdot 10^{-1}$
9. Tetrakosansäure	$2,3 \cdot 10^{-1}$

Einfach-ungesättigte Säuren

10.	Δ 4-Tetradecensäure	$5,3 \cdot 10^{-3}$
11.	5-Tetradecensäure	$1,6 \cdot 10^{-2}$
12.	6-Tetradecensäure	$2,6 \cdot 10^{-3}$
13.	7-Tetradecensäure	$2,9 \cdot 10^{-2}$
14.	8-Tetradecensäure	$2,6 \cdot 10^{-3}$
15.	9-Tetradecensäure	$2,1 \cdot 10^{-1}$
16.	10-Tetradecensäure	$2,6 \cdot 10^{-3}$
17.	11-Tetradecensäure	$2,6 \cdot 10^{-3}$

18.	Δ 6-Hexadecensäure	$2,6 \cdot 10^{-1}$
19.	7-Hexadecensäure	$9,4 \cdot 10^{-1}$
20.	9-Hexadecensäure	7,2
21.	11-Hexadecensäure	$1,7 \cdot 10^{-1}$
22.	8-Oktadecensäure	$4,5 \cdot 10^{-1}$
23.	9-Oktadecensäure	37,6
24.	11-Oktadecensäure	6,7
25.	9-Eikosensäure	$3,9 \cdot 10^{-2}$
26.	10-Eikosensäure	$1,3 \cdot 10^{-2}$
27.	11-Eikosensäure	$5,1 \cdot 10^{-1}$
28.	12-Eikosensäure	$6,6 \cdot 10^{-3}$
29.	13-Eikosensäure	$8,6 \cdot 10^{-2}$
30.	?-Dokosensäure	$<10^{-3}$
31.	?-Tetrakosensäure	$<10^{-3}$

Zweifach-ungesättigte Säuren

32.	Δ 6,9-Oktadekadiensäure	$4,9 \cdot 10^{-1}$
33.	8,11-Oktadekadiensäure	$1,9 \cdot 10^{-1}$
34.	9,12-Oktadekadiensäure	4,2
35.	7,10-Eikosadiensäure	$3,9 \cdot 10^{-3}$
36.	8,11-Eikosadiensäure	$1,6 \cdot 10^{-2}$
37.	9,12-Eikosadiensäure	$7,7 \cdot 10^{-3}$
38.	10,13-Eikosadiensäure	$2,8 \cdot 10^{-3}$
39.	11,14-Eikosadiensäure	$2,5 \cdot 10^{-2}$

Dreifach-ungesättigte Säuren

40.	Δ	6,9,12-Oktadekatriensäure	$1,4 \cdot 10^{-2}$
41.		9,12,15-Oktadekatriensäure	$8,4 \cdot 10^{-2}$
42.		5,8,11-Eikosatriensäure	$1,6 \cdot 10^{-2}$
43.		8,11,14-Eikosatriensäure	$1,6 \cdot 10^{-1}$
44.		9,12,15-Eikosatriensäure	$8,2 \cdot 10^{-3}$
45.		11,14,17-Eikosatriensäure	$1,8 \cdot 10^{-2}$

Vierfach-ungesättigte Säuren

46.	Δ	5,8,11,14-Eikosatetraensäure	1,6
-----	----------	------------------------------	-----

Fünffach-ungesättigte Säuren

47.	Δ	7,10,13,16,19-Dokosapentaensäure	$1,3 \cdot 10^{-1}$
-----	----------	----------------------------------	---------------------

Sechsfach-ungesättigte Säuren

48.	Δ	4,7,10,13,16,19-Dokosahexaensäure	$5,2 \cdot 10^{-1}$
			$\sum 99,9 \%$

Die Zusammenstellung erlaubt einen geschlossenen Blick über alle 48 im Fett der menschlichen Fettleber nachgewiesenen Säuren. Es ist wahrscheinlich, daß die aufgrund gaschromatographischer Analysen errechneten Konzentrationen der einzelnen Vertreter wegen des verwickelten und vielteiligen Arbeitsganges nicht ganz genau sind. Sicher dürfte jedoch die angegebene Größenordnung in jedem Fall sein. Vor allem kam es aber darauf an, die Hauptvertreter im menschlichen Leberfett festzustellen und Aussagen darüber zu treffen, welche Säuren als Nebenbestandteile, bzw. nur in Spuren, zugegen waren.

Als Hauptkomponenten konnten Hexadekan- und Oktadekansäure sowie Hexadecen-, Oktadecen- und Oktadekadiensäure festgestellt werden. Auf diese Fettsäuren entfielen allein 93 % des Gesamtgemisches. Auf die restlichen 7 % verteilte sich vor allem die große Zahl ungesättigter Stellungsisomerer, von denen Δ 7-Hexadecensäure und Δ 5,8,11,14-Eikosatetraensäure (Arachidonsäure) mit je etwa 1 % Nebenbestandteile darstellten. Zu den Nebenbestandteilen war auch die Tetradekansäure zu rechnen (2,2 %). Für die restlichen Vertreter lag die Konzentration meist wesentlich darunter. Wenn die weitaus überwiegende Zahl der identifizierten Säuren auch nur in zum Teil verschwindender Konzentration zugegen war, dürfte ihr Nachweis dennoch von großer Wichtigkeit sein. Er läßt die Möglichkeit zu, in sich geschlossene Reihen verschiedener Fettsäuretypen aufzustellen, die biogenetische Zusammenhänge deutlich werden lassen (s. S. 104).

Von den 48 identifizierten Fettsäuren konnten 17 isoliert und mit Ausnahme der n-Dokosan- und n-Tetrakosensäure in hochreiner Form vorgelegt werden. Lediglich im Fall der Pentadekan-, Heptadekan-, Dokosen- und Tetrakosensäure stützte sich die Identifizierung allein auf die gaschromatographische Analyse mit Hilfe von Vergleichssubstanzen. Der Nachweis dieser Säuren im menschlichen Leberfett dürfte dennoch sicher sein. Verteilte man alle 48 identifizierten Säuren auf die drei Reihen der gesättigten, einfach-ungesättigten und mehrfach-ungesättigten Vertreter, so ergab sich folgendes Bild:

Gesättigte Säuren	38,1 %
Einfach-ungesättigte Säuren	54,3 %
Mehrfach-ungesättigte Säuren	7,5 %.

Von den 7,5 % der mehrfach-ungesättigten Säuren entfielen allein 5 % auf die biochemisch wichtigen essentiellen Fettsäuren Linol- und Linolensäure.

II. Über das Verhalten stellungsisomerer ungesättigter Fettsäuremethylester bei der Anwendung physikalisch-chemischer Trennverfahren

A. Allgemeines

Die Isolierung und Identifizierung einzelner Fettsäuren aus natürlich vorkommenden Fetten bereitet heute prinzipiell keine Schwierigkeiten mehr. Die anfallenden Trennprobleme können durch Kombination weniger physikalisch-chemischer Trennverfahren gelöst werden. Zu ihnen gehören die analytische und präparative Gaschromatographie, die Chromatographie mit Hilfe von Quecksilberacetataddukten und vor allem die Hochvakuumdestillation unter Verwendung hochwirksamer Destilliersäulen.

Bei Anwendung dieser Trennverfahren waren einige interessante Eigenschaften ungesättigter Fettsäureester aufgefallen, die im folgenden für die einzelnen Verfahren diskutiert werden sollen.

B. Gaschromatographie

In einer früheren Arbeit des Autors (34) waren bereits detaillierte Studien über das Verhalten ungesättigter Fettsäuremethylester bei der Gas-Flüssigkeitschromatographie auf polaren und unpolaren Trennsäulen durchgeführt worden. Im wesentlichen war man dabei zu folgenden Ergebnissen gekommen:

Auf polaren Trennsäulen werden ungesättigte Fettsäureester stärker festgehalten als gesättigte. Ungesättigte Fettsäureester haben also längere Retentionszeiten als gesättigte. Treten mehrere Doppelbindungen in das Molekül ein, dann werden die einzelnen Sättigungsgrade (bei gleichblei-

bender Kettenlänge) in der Reihenfolge Monoen $\longrightarrow$ Dien $\longrightarrow$ Trien $\longrightarrow$ Tetraen usw. von der Trennsäule eluiert, d. h., das Molekül mit dem niedrigsten Sättigungsgrad (hier das Tetraen) besitzt die längste Retentionszeit. Mit der Zahl der Doppelbindungen steigt also auch die Retentionszeit des Moleküls an. Aber auch innerhalb eines Sättigungsgrades (bei gleicher Kettenlänge) waren interessante Eigenschaften bemerkt worden. Verschiebt sich die Doppelbindung zum Beispiel in Richtung auf das Methylenende der Fettsäure, so erhöht sich die Retentionszeit ebenfalls.^{*)} So erschienen z. B. die verschiedenen cis-Pentadecensäuremethylester auf Polydiäthylenglykolsuccinatsäulen in der Reihenfolge:

1. cis- Δ 5-Pentadecensäureester
2. cis- Δ 6-Pentadecensäureester
3. cis- Δ 9-Pentadecensäureester.

Cis- Δ 9-Pentadecensäureester besaß von den drei chromatographierten Estern also die größte Retentionszeit. Im allgemeinen reicht jedoch die Trennstufenzahl gepackter Säulen nicht aus, um solche stellungsisomeren Monoene gaschromatographisch voneinander abzutrennen. Es bedarf dazu schon der hohen Trennleistung von Kapillarsäulen, um solche Trennungen erfolgreich durchführen zu können (36). Erst, wenn die Doppelbindung ganz an das Ende der Kohlenstoffkette wandert (Vinylstruktur!), wird eine Abtrennung von begleitenden Stellungsisomeren auch auf gepackten Trennsäulen möglich. So besitzt cis- Δ 9-Decensäuremethylester auf Polydiäthylenglykolsuccinat die gleiche Retentionszeit wie Undekansäure. Entsprechendes wurde auch für das Paar cis- Δ 10-Undecensäuremethylester/Dodekansäuremethylester beobachtet.

*) Es zeigt sich somit bei den ungesättigten Fettsäureestern deutlich eine Abhängigkeit der Retentionszeit vom Methylenende der Fettsäure. Mit kürzer werdendem Methylenende steigt die Retentionszeit an. Vielleicht läßt sich daraus auch schließen, daß für eine ungesättigte Fettsäure mit kürzerem Methylenende die Chance größer ist, einen zweiten Haftpunkt auf der polaren Trennphase zu bekommen als für eine stellungsisomere Säure mit längerem Methylenende.

Für Fettsäureester mit Dreifachbindung konnten analoge Verhältnisse gefunden werden, wobei allerdings zu berücksichtigen war, daß eine Dreifachbindung die Retentionszeit des Esters in stärkerem Maße erhöhte, als das durch eine Doppelbindung geschah.

Für die Stellungsisomeren der mehrfach-ungesättigten Fettsäureester gilt das oben Erwähnte: Verschieben sich die Doppelbindungen in Richtung auf das Methylende der Fettsäure, so wird das Molekül auf der Trennsäule stärker festgehalten. Um solche Unterschiede in den Retentionszeiten stellungsisomerer, mehrfach-ungesättigter Fettsäureester zu ihrer Trennung ausnutzen zu können, darf die Zahl der Individuen nicht zu groß sein, da es sonst leicht wieder zur Überlappung einzelner, bereits getrennter Peaks kommt. Für die Triene der Kettenlänge C_{18} (s. Seite 63) und für die Tetraene mit 20 C-Atomen (34) konnte folgendes festgestellt werden: Liegen zwei stellungsisomere Ester im Gemisch vor, so läßt sich sogar mit gepackten Säulen (Trennstufenzahl $> 1000/m$) eine weitgehende Trennung erzielen, wenn sämtliche Doppelbindungen des einen Isomeren gegenüber denen des anderen um mindestens 3 C-Atome in der Kette verschoben sind. So gelang gaschromatographisch die Trennung des

all-cis- $\Delta^{6,9,12}$ -Oktadekatriensäuremethylesters

vom begleitenden

all-cis- $\Delta^{9,12,15}$ -Oktadekatriensäuremethylester.

Andererseits konnte R. HOFMANN (25) auf gleiche Weise die Trennung folgender stellungsisomerer C_{20} -Tetraene zeigen:

all-cis- $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eikosatetraensäuremethylester

von

all-cis- $\Delta^{8,11,14,17}$ -Eikosatetraensäuremethylester.

Für Diene der Kettenlänge C_{18} (und darunter) reichen die vorhandenen Unterschiede in den Retentionszeiten zu einer Trennung der einzelnen Stellungsisomeren nicht mehr aus. Die identifizierten Oktadekadiene erschienen alle in einem Peak. Die stellungsisomeren Diene und Triene der Kettenlänge C_{20} konnten gaschromatographisch zwar teilweise voneinander getrennt werden, jedoch war die Zahl der Isomeren in diesen Präparaten so groß, daß es dadurch rückläufig wieder zu Überschneidungen einzelner Peaks kam. Klare Aussagen sind mit dem nur spärlich vorliegenden Material hier deshalb zur Zeit noch nicht möglich. Die genannten Eigenschaften wurden an ungesättigten Fettsäureestern mit all-cis-Konfiguration beobachtet.

Auf unpolaren gaschromatographischen Säulen erfolgt die Trennung im allgemeinen nach dem Siedepunkt, d. h., ungesättigte Fettsäureester erscheinen vor den gesättigten gleicher Kettenlänge. Eine Trennung der verschiedenen Sättigungsgrade ist in den meisten Fällen nicht durchführbar. Die auf polaren Trennsäulen beobachteten Unterschiede in den Retentionszeiten der einzelnen, stellungsisomeren ungesättigten Fettsäureester treten hier ganz in den Hintergrund und sind kaum noch meßbar.

C. Säulenchromatographische Trennungen mit Hilfe von Quecksilberaddukten

H. ANDREAS (40, 41) hatte die Möglichkeit einer Trennung geometrischer Isomere mit Hilfe von Quecksilberaddukten aufgrund unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeiten beschrieben, und B. KUCHENBUCH (23) war es gelungen, ungesättigte Fettsäuremethylester in Form ihrer Quecksilberaddukte von begleitenden Stellungsisomeren abzutrennen, wenn die Doppelbindung in $\Delta 2$, $\Delta 3$ oder $\Delta (\omega - 1)$ stand. Für diese Trennungen waren ebenfalls unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten zwischen den isomeren Estern und dem Quecksilber(II)-acetat ausschlaggebend.

Darüber hinaus besteht jedoch immer noch keine Möglichkeit, Trennungen oder zumindest beträchtliche Anreicherungen bei solchen Isomerenpaaren zu erzielen, deren Doppelbindungen sich mehr in der Mitte einer längeren Kohlenstoffkette befinden.

Auch R. HOFMANN (30) konnte bei der Chromatographie der Quecksilberaddukte stellungsisomerer Oktadecensäureester in den Fraktionen seines Trennungsganges lediglich eine geringfügige Anreicherung des einen von zwei vorhandenen Isomeren erreichen. Neben Δ 9-Oktadecensäureester, als Hauptbestandteil, lagen in den einzelnen Fraktionen des Trennungsganges unterschiedliche Mengen an Δ 11-Oktadecensäureester vor. Der Gehalt am Δ 11-Isomeren stieg von 4 % in der ersten Fraktion auf 6 % in der letzten an. Damit war die Anreicherung zwar nur minimal, aber das Ergebnis war doch insofern interessant, als damit gezeigt werden konnte, daß auch die Quecksilberaddukte stellungsisomerer, ungesättigter Fettsäuren Unterschiede in der Haftfestigkeit am Kieselgel aufweisen. Vielleicht wären sie mit Hilfe der Gradientelution noch weiter auszunutzen. Bei der von HOFMANN durchgeführten Trennung haftete das Δ 11-Isomere fester am Kieselgel als das Δ 9-Isomere. Δ 11-Oktadecensäureester war daher in den letzten Fraktionen des Trennungsganges am stärksten angereichert. Verschiebt sich also die Doppelbindung wieder in Richtung auf das Methylenende der Fettsäure, so ist damit zu rechnen, daß die aus solchen Isomeren entstehenden Quecksilberaddukte größere Haftfestigkeit am Sorbens besitzen als jene, bei denen das Quecksilbersalz mehr in der Mitte der Kohlenstoffkette angelagert wird.

D. Hochvakuumdestillation

Mit Hilfe polarer Trennsäulen ließen sich die einzelnen Sättigungsgrade der Fettsäuren einer Kettenlänge gaschromatographisch ohne weiteres voneinander trennen. Eine solche Feinfraktionierung ist selbst mit Hilfe hochwirksamer Destilliersäulen vom Typ der Ringspaltsäulen aufgrund zu geringer Siedepunktsdifferenzen der Stoffe ausgeschlossen. Auf destillativem Wege wird man sich meist mit einer Auftrennung in Fraktionen einheitlicher Kettenlänge begnügen müssen und allenfalls Mengenverschiebungen innerhalb der einzelnen Sättigungsgrade erwarten können.

Dennoch gelang es R. HOFMANN (25) bei der Destillation der Fettsäuremethylester des Dorschöls in einigen Fraktionen zu deutlichen Mengenverschiebungen sogar zwischen stellungsisomeren ungesättigten Estern zu kommen. Aus einer Destillatfraktion konnte er ein Gemisch von zwei Eikosatetraensäuremethylestern isolieren, in dem neben dem

Δ 5,8,11,14-Isomeren, als Hauptkomponente, nur geringe Mengen des Δ 8,11,14,17-Isomeren enthalten waren. In einer höhersiedenden Fraktion war eine deutliche Mengenverschiebung zugunsten des Δ 8,11,14,17-Eikosatetraensäuremethylesters feststellbar. Im Δ 8,11,14,17-Isomeren waren die Doppelbindungen wieder weiter in Richtung auf das Methylende der Kette verschoben. Es scheint wohl so, daß hier bei der Destillation der polare Charakter aller in der Destillationsblase vorhandenen Estermolekeln eine entscheidende Rolle spielt und wie eine polare Trennphase in der Gaschromatographie wirkt. Aus dieser polaren Phase werden dann die stärker polarisierbaren Moleküle erst bei höherer Temperatur wieder abgegeben.

Danach konnten bei der Gaschromatographie, bei der Chromatographie mit Hilfe von Quecksilberaddukten und auch bei der Hochvakuumdestillation übereinstimmend Unterschiede in den Eigenschaften zwischen stellungsisomeren ungesättigten Fett-

säuremethylestern bzw. ihren Addukten festgestellt werden. Sie traten bei der Gaschromatographie erwartungsgemäß am deutlichsten in Erscheinung.

III. Diskussion der Ergebnisse

A. Allgemeines

Im Jahre 1961 berichtete E. KLENK (35) erstmals zusammenfassend über die von ihm eingeführte Systematik der ungesättigten Fettsäuren. Danach kann die Mehrzahl der natürlich vorkommenden ungesättigten Fettsäuren in einige wenige Fettsäuretypen, bzw. Fettsäurereihen eingeordnet werden. In die bis dahin vorhandene verwirrende Vielfalt dieser im Tier- und Pflanzenreich so weit verbreiteten Stoffklasse konnte dadurch Übersicht und Ordnung gebracht werden. Zugleich wurde eine exakte Gliederung nach rein chemischen Gesichtspunkten möglich. Diese Systematik gilt für ungesättigte Säuren mit 14 - 24 Kohlenstoffatomen und 1 - 6 Doppelbindungen im Molekül. Nach KLENK ist dabei das jeweilige Methylen charakteristisch für die ungesättigten Individuen. Teilt man die natürlich vorkommenden ungesättigten Fettsäuren deshalb nach der Länge ihres Methylenes ein, so ergeben sich folgende fünf Typen:

1. Myristoleinsäuretyp *)
(Methylen mit 5 C-Atomen)
2. Palmitoleinsäuretyp
(Methylen mit 7 C-Atomen)
3. Ölsäuretyp
(Methylen mit 9 C-Atomen)
4. Linolsäuretyp
(Methylen mit 6 C-Atomen)
5. Linolensäuretyp
(Methylen mit 3 C-Atomen).

*) Der Myristoleinsäuretyp wurde von KLENK nicht beschrieben (s. auch Seite 50).

Zählt man also in ungesättigten Fettsäuren von der Methylgruppe (ω) bis zum Ausgangspunkt der ersten Doppelbindung, dann liegt diese an der gleichen Stelle wie in einer dieser fünf Fettsäuren. Damit läßt sich diese Doppelbindung auch folgendermaßen fixieren:

- | | |
|------------------------|--|
| 1. Myristoleinsäuretyp | erste Doppelbindung in $\Delta (\omega-5)$ |
| 2. Palmitoleinsäuretyp | erste Doppelbindung in $\Delta (\omega-7)$ |
| 3. Ölsäuretyp | erste Doppelbindung in $\Delta (\omega-9)$ |
| 4. Linolsäuretyp | erste Doppelbindung in $\Delta (\omega-6)$ |
| 5. Linolensäuretyp | erste Doppelbindung in $\Delta (\omega-3)$. |

Sämtliche in der Natur vorkommenden ungesättigten Fettsäuren besitzen nach KLENK und STOFFEL (35, 7) all-cis-Konfiguration. Die Doppelbindungen sind bei den Polyenfettsäuren isoliert und im Polyallylrhythmus (Divinylmethanrhythmus) angeordnet. Es handelt sich bei den mehrfach-ungesättigten Fettsäuren also um 1,4-olefinische Systeme (di- bis hexa-olefinische Systeme).

Es galt nun, die Vielzahl der in dieser Arbeit identifizierten ungesättigten Fettsäuren dieser Systematik zu unterwerfen. Dabei kam man zu folgenden Ergebnissen:

1. Myristoleinsäuretyp $\Delta (\omega-5)$:

- 9-Tetradecensäure
- 11-Hexadecensäure

2. Palmitoleinsäuretyp $\Delta (\omega-7)$:

- 7-Tetradecensäure
- 9-Hexadecensäure
- 11-Oktadecensäure
- 13-Eikosensäure
- 8,11-Oktadekadiensäure
- 10,13-Eikosadiensäure

3. Ölsäuretyp $\Delta (\omega - 9)$:

- 5-Tetradecensäure
- 7-Hexadecensäure
- 9-Oktadecensäure
- 11-Eikosensäure
- 6,9-Oktadekadiensäure
- 8,11-Eikosadiensäure
- 5,8,11-Eikosatriensäure

4. Linolsäuretyp $\Delta (\omega - 6)$:

- 9,12-Oktadekadiensäure
- 11,14-Eikosadiensäure
- 6,9,12-Oktadekatriensäure
- 8,11,14-Eikosatriensäure
- 5,8,11,14-Eikosatetraensäure

5. Linolensäuretyp $\Delta (\omega - 3)$:

- 9,12,15-Oktadekatriensäure
- 11,14,17-Eikosatriensäure
- 7,10,13,16,19-Dokosapentaensäure
- 4,7,10,13,16,19-Dokosahexaensäure

Neben dieser Einteilung konnten noch folgende, spezifisch in $\Delta 9$ dehydrierte Säuren (s. Seite 110) zu einer Gruppe zusammengefaßt werden:

- 9-Tetradecensäure
- 9-Hexadecensäure
- 9-Oktadecensäure
- 9-Eikosensäure

Davon gehörten allerdings die ersten drei Glieder gleichzeitig obigen Fettsäurereihen an. Nur $\Delta 9$ -Eikosensäure ließ sich nach KLENK nicht einordnen. Damit waren immerhin 25 von insgesamt 39 ungesättigten Individuen untergebracht. Dokosen- und Tetrakosensäure konnten wegen zu geringer Menge nicht aus dem Leberfett isoliert werden. Deshalb

blieb auch die Lage der Doppelbindung in diesen Säuren unbekannt. Nach den Ergebnissen anderer Autoren (29, 45, 47) wäre hier am ehesten mit Vertretern vom Ölsäuretyp zu rechnen gewesen. Danach blieben noch 12 Fettsäuren übrig, die keiner dieser Reihen eingeordnet werden konnten. Es waren dies:

1. Δ 4-Tetradecensäure
2. Δ 6-Tetradecensäure
3. Δ 8-Tetradecensäure
4. Δ 10-Tetradecensäure
5. Δ 11-Tetradecensäure
6. Δ 6-Hexadecensäure
7. Δ 8-Oktadecensäure
8. Δ 10-Eikosensäure
9. Δ 12-Eikosensäure
10. Δ 7,10-Eikosadiensäure
11. Δ 9,12-Eikosadiensäure
12. Δ 9,12,15-Eikosatriensäure

Die Säuren 1,5,6,11 und 12 konnten auch an anderer Stelle (29, 45) bei der Untersuchung pflanzlicher Öle identifiziert werden. Sie dürften deshalb mit der Nahrung in das Leberfett gelangt sein. Offenbar besitzt die pflanzliche Zelle Enzymsysteme, die Dehydrierungen an so exponierten Stellen im Molekül möglich machen.

Damit verblieben noch die Säuren 2,3,4,7,8,9 und 10. Von diesen konnten die Nummern 3,7 und 8 als Produkte von Überoxydationen bei der Spaltung nach v. RUDLOFF entstanden sein. Sie waren auch nur in einer Menge von ca. 1 %, bezogen auf das zur oxydativen Spaltung eingesetzte jeweilige Isomerengemisch, anwesend (die Genauigkeit der Methode nach v. RUDLOFF liegt bei 0,9 %). Δ 9-Tetradecensäure war Hauptkomponente im isolierten C_{14} -Monoen. Bei der oxydativen Spaltung zwischen dem 9. und 10. C-Atom muß mit einer gewissen Aktivierung der C-Atome 8 und 11 gerechnet werden, die dann ebenfalls angegriffen werden können. Dadurch wäre

die Anwesenheit von Δ 8- und Δ 11-Tetradecensäure erklärbar. Für das Auftreten von Δ 8-Oktadecensäure (Δ 9-Oktadecensäure war hier Hauptprodukt) könnte dann ähnliches angenommen werden. Die Gegenwart von Δ 10-Eikosensäure würde schließlich durch Überoxydation des Hauptvertreters, der Δ 11-Eikosensäure, verständlich.

Interessant war, daß J. JACOB und G. GRIMMER (48) bei der Untersuchung der einfach-ungesättigten Fettsäuren des menschlichen Depotfettes sechs dieser 12 Isomeren mit 14, 16 und 18 Kohlenstoffatomen ebenfalls identifizieren konnten. Es handelte sich um

- Δ 6-Tetradecensäure
- Δ 8-Tetradecensäure
- Δ 10-Tetradecensäure
- Δ 11-Tetradecensäure
- Δ 6-Hexadecensäure und
- Δ 8-Oktadecensäure.

JACOB und GRIMMER vermuteten für einige dieser anomalen Stellungsisomeren die Herkunft aus pflanzlichen Nahrungsfetten. Sie diskutierten die Möglichkeit einer Verschiebung von Doppelbindungen während des technischen Prozesses bei der Verarbeitung (Hydrierung!) pflanzlicher Öle. So könnte aus Δ 9-Oktadecensäure das Δ 8-Isomere entstanden sein. β -Oxydation von Δ 8-Oktadecensäure könnte dann zu Δ 6-Hexadecensäure und weiter zu Δ 4-Tetradecensäure geführt haben. Trotzdem muß man aber auch hier die mögliche Überoxydation bei der Spaltung nach v. RUDLOFF mit in Betracht ziehen.

B. Biosynthese und Stoffwechsel der Fettsäuren

1. Gesättigte Fettsäuren

Die Biosynthese gesättigter Fettsäuren kann prinzipiell mit Hilfe zweier verschiedener Enzymsysteme erfolgen. Das eine Multienzymsystem ist die sogenannte Fettsäuresynthetase, die über den Acetatpool, ausgehend von Acetyl-CoA^{*)} mit Hilfe von Malonyl-CoA^{*)}, die gesättigten Säuren de novo und vorwiegend bis zur Kettenlänge C₁₆ aufbaut. Startsubstanz ist hier immer Acetyl-CoA. Dieses Enzymsystem konnte von LYNEN (49) und WAKIL (50) für die pflanzliche und tierische Zelle isoliert werden. STOFFEL et al. (51) fanden ein zweites Multienzymsystem, welches vorwiegend die längeren gesättigten Kohlenstoffketten C₁₆, C₁₈ und C₂₀ aufbaut und auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums strukturgebunden angeordnet ist. Die Fettsäuresynthetase konnte dagegen aus dem Cytoplasma herausgelöst werden. Mit Hilfe dieses zweiten Enzymsystems, das Lipoproteidstruktur besitzt (die Hefesynthetase ist nach LYNEN lipoidfrei), kommt es nach STOFFEL zu keiner de novo-Synthese, ausgehend von Acetyl-CoA. Vielmehr werden nur bereits vorhandene langkettige gesättigte Säuren in Form ihrer Acyl-CoA-Ester mit Hilfe von Malonyl-CoA v e r l ä n g e r t . Nach STOFFEL werden unter gleichen Bedingungen gesättigte Fettsäuren mit 14, 16 und 18 C-Atomen aufgebaut. Die Ausbeute dürfte ihr Maximum bei der Kettenlänge C₁₆ haben und fällt später schnell ab. Siehe hierzu auch die Zusammensetzung des menschlichen Leberfettes auf Seite 94.

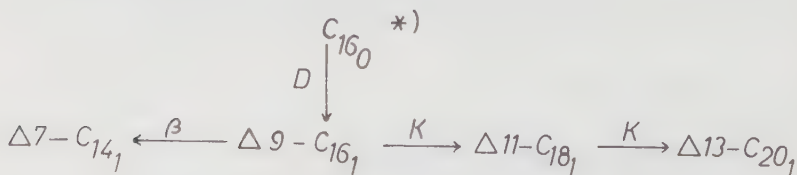
^{*)} Acetyl-CoA = Acetyl-Coenzym A
Malonyl-CoA = Malonyl-Coenzym A

2. Ungesättigte Fettsäuren

Ungesättigte Fettsäuren mit einer Doppelbindung im Molekül können biochemisch prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen entstehen:

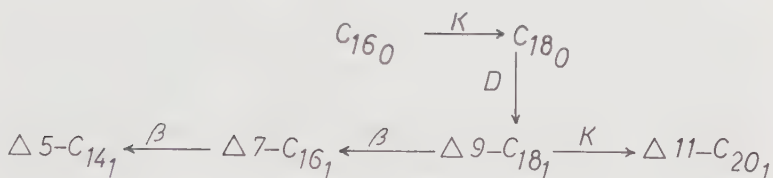
1. durch Dehydrierung von gesättigten Säuren
2. durch Kettenverlängerung von bereits vorhandenen einfach-ungesättigten Vertretern.

Die Olefinierungsreaktion ist nach STOFFEL (52) absolut von molekularem Sauerstoff abhängig und verläuft somit aerob. Die tierische und pflanzliche Zelle muß Enzymsysteme besitzen, die eine gesättigte Fettsäure offenbar bevorzugt und relativ leicht stellungsspezifisch zwischen dem 9. und 10. Kohlenstoffatom (gerechnet von der Carboxylgruppe) dehydrieren können. Vorwiegend durch Kettenverlängerung und nur in sehr geringem Ausmaß (bis zu etwa 3 %, bezogen auf die jeweilige Muttersubstanz) durch β -Oxydation entstehen dann aus diesen in $\Delta 9$ dehydrierten Säuren die verschiedenen Vertreter der oben genannten Myristolein-, Palmitolein- und Ölsäurereihe. So könnte $\Delta 11$ -Hexadecensäure durch Kettenverlängerung aus $\Delta 9$ -Tetradecensäure hervorgegangen sein. $\Delta 9$ -Tetradecensäure wird dann sicherlich aus n-Tetradekansäure durch Dehydrierung entstanden sein. In der Palmitoleinsäurereihe wäre danach folgende Sequenz denkbar:



*) Der Index steht für die Anzahl der Doppelbindungen, β für β -Oxydation, K für Kettenverlängerung um jeweils zwei C-Atome und D für Dehydrierung.

Für die Ölsäurereihe könnte dann das folgende Schema Gültigkeit besitzen:



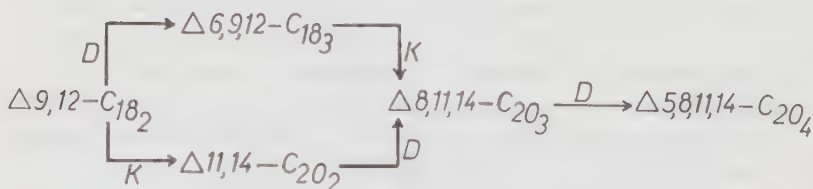
Übergänge zwischen den einzelnen Reihen sowie Hydrierungen bereits vorhandener Doppelbindungen können mit Sicherheit ausgeschlossen werden (51, 52, 53, 54).

Ungesättigte Fettsäuren mit zwei oder mehr Doppelbindungen im Molekül sind bis zur Kettenlänge C_{16} einschließlich in tierischen und menschlichen Fetten nur spärlich vertreten. Die große Zahl der Polyenfettsäuren besitzt im allgemeinen Kettenlängen mit 18 bis 22 C-Atomen und gehört überwiegend dem Linol- und Linolensäuretyp an. Die Biosynthese dieser mehrfach-ungesättigten Fettsäuren vollzieht sich in der tierischen und menschlichen Zelle anders als die der einfach-ungesättigten Säuren (s. oben). Zwar spielen sich auch hier die beiden chemisch voneinander unabhängigen Reaktionsschritte der Kettenverlängerung und Dehydrierung ab, trotzdem bestehen aber wesentliche Unterschiede:

1. Verlängert werden nur Kohlenstoffketten
e s s e n t i e l l e r Fettsäuren (s. unten).
2. Doppelbindungen werden nur im
P o l y a l l y l r h y t h m u s mit
a l l - c i s - Konfiguration und ausschließlich
in Richtung auf das C a r b o x y l e n d e
der Fettsäure hin eingeführt.

Die tierische und menschliche Zelle bedarf also zum Aufbau der Polyenfettsäuren des Linol- und Linolensäuretyps der Zufuhr essentieller Fettsäuren. Als essentielle Fettsäuren gelten heute Linolsäure ($\Delta 9,12$ -Oktadekadiensäure) und Linolensäure ($\Delta 9,12,15$ -Oktadekatriensäure). Aus diesen beiden Fettsäuren werden sämtliche Polyenfettsäuren des Linol- und Linolensäuretyps gebildet. Der essentielle Charakter dieser beiden Fettsäuren drückt sich im Unvermögen der tierischen und menschlichen Zelle aus, zu einer in $\Delta 9$ stehenden Doppelbindung weitere in Richtung auf das Methylenende der gleichen Säure hin einführen zu können.

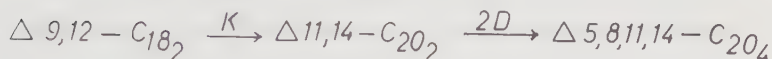
Für den Linolsäuretyp wären nach den Ergebnissen dieser Arbeit folgende Übergänge möglich:



Bereits 1957 bewiesen MEAD et al. (55) die obere Sequenz als Hauptweg für die in vivo ablaufende Biosynthese der Arachidonsäure ($\Delta 5,8,11,14-C_{20}_4$) aus Linolsäure bei der Ratte. In welchem Ausmaß auch der untere Weg beschritten wird, bleibt vorerst noch offen. Immerhin konnten γ -Linolensäure^{*)} und $\Delta 11,14-C_{20}$ -Dien in fast gleicher Menge im menschlichen Leberfett aufgefunden werden. Neben diesen

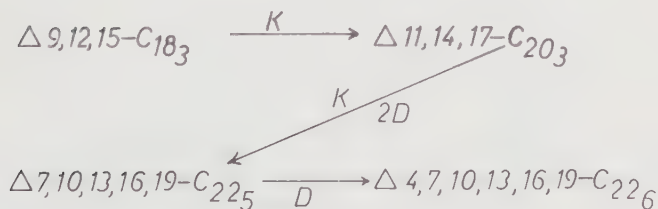
*) $\Delta 6,9,12-C_{18}$ -Trien wird auch als γ -Linolensäure bezeichnet.

Übergängen fanden STOFFEL et al. (51, 53) bei ihren in vitro-Versuchen einen zweiten, kürzeren Weg der Bildung von Arachidonsäure aus Linolsäure:



Hiernach entsteht die Arachidonsäure aus Linolsäure durch Kettenverlängerung über C_{20} -Dien und Einführung zweier Doppelbindungen. Auch dieser Weg wäre hier prinzipiell denkbar.

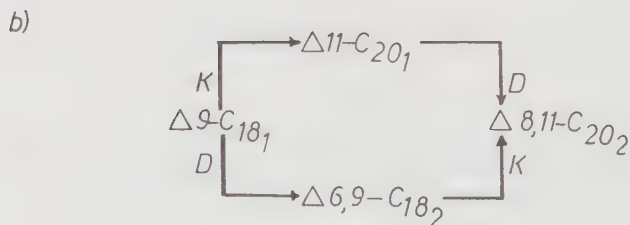
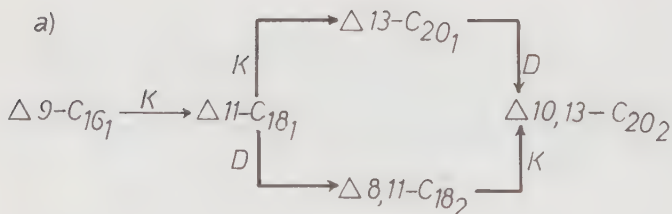
In der Linolensäurereihe wurde C_{22} -Hexaen als Endprodukt der sich abspielenden Dehydrierungs- und Kettenverlängerungsreaktionen gefunden. Es dürfte in der menschlichen Leber wohl auf folgendem Weg aus Linolensäure entstanden sein:



Die Fettsäuren vom Linolsäuretyp waren mit 6 % der Gesamtfettsäuren in der menschlichen Fettleber gegenüber denen vom Linolensäuretyp (0,8 %) mengenmäßig weitaus vorherrschend. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen, die von anderer Seite (6) für die tierische Zelle erbracht werden konnten.

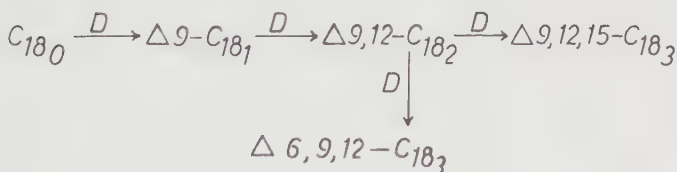
Hydrierungen vorhandener Doppelbindungen und Übergänge zwischen Vertretern des Linol- und Linolensäuretyps wurden bisher nicht beobachtet (51, 52).

Nur vier Polyenfettsäuren (Dienfettsäuren) konnten im Leberfett identifiziert werden, die nicht den eben besprochenen Säuretypen, sondern der Palmitoleinsäure- bzw. Ölsäurereihe angehörten. Es waren dies $\Delta 8,11\text{-C}_{18}$ -Dien und $\Delta 10,13\text{-C}_{20}$ -Dien, die beide zum Palmitoleinsäuretyp (a) gehörten, sowie $\Delta 6,9\text{-C}_{18}$ -Dien und $\Delta 8,11\text{-C}_{20}$ -Dien vom Ölsäuretyp (b). Sie könnten folgendermaßen entstanden sein:



Danach könnte der Biosyntheseweg beider C_{20} -Diene aus den zugehörigen C_{18} -Monoenen prinzipiell über verschiedene Zwischenstufen verlaufen sein. Entweder wurde erst die Kohlenstoffkette verlängert und dann dehydriert (oberer Weg) oder umgekehrt (unterer Weg). Welcher von beiden Wegen bevorzugt beschritten wurde, muß offen bleiben. Auf jeden Fall wurde auch hier die zweite Doppelbindung wieder ausschließlich in den Carboxylteil der Fettsäuren eingebaut.

Demgegenüber kann die pflanzliche Zelle in einfach-ungesättigte Fettsäuren weitere Doppelbindungen sowohl in den Methylteil als auch in den Carboxylteil einbauen. Die pflanzliche Zelle ist daher in der Lage, folgende Reaktion zu katalysieren (39):



Essentielle Fettsäuren sind im Reich der Pflanzen und Pilze daher unbekannt.

Die Beweise für die Gültigkeit der oben skizzierten Stoffwechselwege ungesättigter Fettsäuren stehen für den vorliegenden Fall des menschlichen Leberfettes noch aus. Nur in der tierischen und pflanzlichen Zelle war es bisher möglich, diese Wege mit Hilfe radioaktiv markierter Verbindungen zu beweisen.

Der biologische Abbau gesättigter Fettsäuren wurde von LYNEN (56) aufgeklärt und im β -Oxydationscyclus zusammengefaßt. Aufgrund detaillierter Untersuchungen von STOFFEL (57, 58, 59) erfolgt der biochemische Abbau ungesättigter Fettsäuren gleichfalls nach dem Prinzip der β -Oxydation, allerdings in einem erweiterten Cyclus. Die wesentlichen Zwischenstufen dieses erweiterten β -Oxydationscyclus sind cis- β,γ - und cis- α,β -Enoyl-CoA-Verbindungen, die im weiteren Verlauf der Reaktion enzymatisch zu β -Hydroxyacyl-CoA-Estern hydratisiert werden. Damit ist gleichzeitig der Anschluß an den konventionellen β -Oxydationscyclus gewonnen. Aus seinen Untersuchungen folgerte STOFFEL, daß ein p a r t i e l - l e r Abbau und Wiederaufbau ungesättigter Fettsäuren nicht stattfindet. Ist die ungesättigte Säure einmal am Multienzymkomplex der β -Oxydation angelangt, so wird das Molekül vollständig verbrannt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Auf den folgenden Seiten werden die zur Isolierung und Identifizierung der einzelnen Fettsäuren benutzten Arbeitsmethoden im Detail beschrieben.

I. Extraktion der Glyceride aus dem Gewebe der menschlichen Leber

Zur Extraktion der Glyceride wurde das Lebergewebe zunächst in einer Küchenmaschine (in Portionen zu je 200 g) mechanisch vorzerkleinert und anschließend im Ultra-Turrax bei Umdrehungszahlen von ca. 20000/min (unter Kühlung mit Eiswasser) weitgehendst zerstört. Um die vorhandenen Glyceride aus dem entstandenen Zellbrei zu extrahieren, setzte man 1000 ml Chloroform/Methanol (Volumenverhältnis 2 : 1) zu und kochte 1 Stunde unter Stickstoffatmosphäre am Rückflußkühler. Nach dem Erkalten wurde vom Zellgewebe abfiltriert, und das Filtrat im Vakuum bei einer Temperatur von maximal 60 °C zu einer sirupösen, orangefarbenen Masse eingedampft. Auf diese Weise konnten aus 2 menschlichen Fettlebern, mit einem Feuchtgewicht von zusammen 3300 g, insgesamt 500 g Glyceride gewonnen werden. Zur weiteren Aufarbeitung war es notwendig, die erhaltenen Glyceride in die zugehörigen Fettsäuremethylester umzuestern.

II. Umesterung der extrahierten Glyceride in die Methylester

500 g aus menschlichem Fettlebergewebe extrahierte Glyceride wurden in 1000 ml Methanol, das 2 % Chlorwasserstoff enthielt, unter Zusatz von 1000 ml Benzol, als Lösungsmittel, dreieinhalb Stunden unter Stickstoffatmosphäre am Rückflußkühler gekocht. Danach ließ man erkalten und ent-

fernte von den entstandenen 2 Phasen die untere, die vorwiegend aus Glycerin, Methanol und Wasser bestand. Um in diese Phase übergegangene Ester zurückzugewinnen, versetzte man mit reichlich Wasser und extrahierte einmal mit Benzol. Den benzolischen Extrakt gab man zur Hauptmenge der Ester und ersetzte außerdem die abgetrennte untere Phase durch die gleiche Menge frische methanolische Salzsäure. Hierauf wurde nochmals drei Stunden zum Sieden erhitzt und dann endgültig abgekühlt. Durch Zusatz von 1,5 Liter Wasser konnte die Lösung in zwei Phasen aufgetrennt werden. Die untere Phase extrahierte man zweimal mit Benzol und gab die benzolischen Extrakte wieder zur Hauptmenge der entstandenen Ester, die in der oberen Schicht gelöst waren. Anschließend wurde 1 Liter frischdestillierter Äther hinzugefügt und einige Male vorsichtig umgeschwenkt. Die sich absetzende ätherische Schicht wurde abgetrennt und zunächst mit 200 ml einer wässrigen 5%igen Natriumhydrogencarbonatlösung daraufhin noch dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Die ätherische Lösung der Ester trocknete man nun über Natriumsulfat und zog das Lösungsmittel anschließend im Vakuum bei einer Temperatur von maximal 30 °C ab. Die zurückgebliebenen, dunkelbraun gefärbten Ester (328 g) wurden zur Reinigung einer Kurzwegdestillation im Zweikugelfrohr bei 10^{-3} Torr unterworfen. Bei Temperaturen zwischen 90 und 140 °C ging die Hauptmenge der Ester in Form einer fast wasserklaren, leichtbeweglichen Flüssigkeit über. Aus zwei menschlichen Fettlebern standen danach insgesamt 291 g an Fettsäuremethylestern als Ausgangssubstanz zur Verfügung.

III. Verseifung

Bei den isolierten Fettsäureestern handelte es sich um biologisches Material. Es war deshalb mit der Anwesenheit unverseifbarer Anteile zu rechnen. Um sie zu entfernen, kochte man 1 g Fettsäuremethylester mit 0,5 g Kaliumhydroxid in 15 ml Methanol (80%ig) eineinhalb Stunden unter Stickstoff-

atmosphäre am Rückfluß. Nach dem Erkalten verdünnte man mit 20 ml Wasser und entfernte eventuell vorhandene Anteile an Unverseifbarem durch zweimaliges Ausschütteln mit je 20 ml Petroläther (Kp. 60 - 70 °C). Anschließend wurde die Seifenlösung mit 25%iger Schwefelsäure wieder angesäuert. Die ausgeschiedenen Fettsäuren wurden durch dreimaliges Schütteln mit je 20 ml Äther extrahiert. Die ätherische Lösung wusch man solange mit destilliertem Wasser, bis dieses neutrale Reaktion zeigte. Dann trocknete man über Natriumsulfat und erhielt die freien Säuren durch Abdampfen des Lösungsmittels.

IV. Veresterung

Die durch Verseifung von unerwünschten Begleitstoffen befreiten Fettsäuren mußten zur gaschromatographischen Analyse wieder in die Methylester überführt werden. Dazu kochte man 1 g Fettsäure in 15 ml 2%iger methanolischer Salzsäure eineinhalb Stunden unter Stickstoff am Rückfluß. Nach dem Erkalten verdünnte man die Lösung mit Wasser auf das Doppelte und extrahierte die ausgeschiedenen Ester durch mehrfaches Schütteln mit dem gleichen Volumen frisch destilliertem Äther. Die ätherischen Auszüge wurden zunächst mit Natriumhydrogencarbonatlösung und dann mit Wasser (bis zur neutralen Reaktion) gewaschen. Nach Trocknen mit Natriumsulfat destillierte man den Äther, eventuell unter Zuhilfenahme einer kleinen Füllkörperkolonne, bei Badtemperaturen bis zu 50 °C ab. Für die zurückgebliebenen Fettsäuremethylester empfahl sich, zwecks Reinigung, eine Kurzwegdestillation im Zweikugelfrohr unter Hochvakuum anzuschließen.

V. Säurezahl

Unter der Säure- oder Neutralisationszahl versteht man den Verbrauch an Kaliumhydroxid, ausgedrückt in mg, der zur Neutralisation der in 1 g Fettsäuremethylester vorhandenen freien Säuren notwendig ist. Zur Bestimmung der Säurezahl fand Alkaliblau 6b als Indikator Verwendung. Zur Herstellung der Indikatorlösung wurden 80 mg Alkaliblau 6b in 100 ml Äthylalkohol gelöst und mit 150 ml Benzol versetzt. Nach 12 Stunden filtrierte man vom ausgeschiedenen Niederschlag ab. 1 g Ester wurden sodann in einem Erlenmeyerkolben in 4 ml der Indikatorlösung aufgelöst und mit n/10-äthanolischer Kalilauge bis zum Umschlag der Farbe von blau nach rot titriert. In gleicher Weise wurde ein Blindversuch ausgeführt.

Zur Berechnung der Säurezahl diene die Formel

$$SZ = \frac{(a-b) \cdot 5,61}{c}$$

a = Verbrauch an n/10-KOH in ml

b = Verbrauch an n/10-KOH in ml (Blindversuch)

c = Einwaage in g.

VI. Herstellung der Quecksilber(II)-acetataddukte ungesättigter Fettsäuremethylester

Nach K. MORGENSTERN (24) errechnet sich die zur Bildung der Quecksilberaddukte ungesättigter Fettsäuren notwendige Menge an Quecksilber(II)-acetat und Methanol nach folgenden Formeln:

$$a = \frac{2,5 \cdot JZ \cdot m}{100} \text{ und}$$

$$b = 25 \cdot a$$

a = Menge Quecksilber(II)-acetat in g

b = Volumen Methanol in ml

m = Menge Fettsäuremethylester in g

JZ = Jodzahl.

Zur Bildung der Quecksilberaddukte löste man die errechnete Menge an Quecksilber(II)-acetat in der zugehörigen Menge Methylalkohol auf. Zu dieser Lösung gab man die abgewogene Menge an Fettsäuremethylester. Nach zweitägigem Stehen unter Stickstoff arbeitete man auf die Addukte hin auf. Dazu wurde zunächst das Lösungsmittel im Vakuum bei maximal 40 °C vollständig abdestilliert. Das zurückgebliebene weiße Kristallpulver wurde anschließend mehrfach mit Benzol ausgezogen und die benzolische Lösung der Addukte nach Absitzenlassen von Schwebstoffen zur vollständigen Klärung durch ein Wattefilter gegeben. Das nunmehr klare Filtrat dampfte man im Vakuum bei höchstens 40 °C ein. Nach Auflösen der erhaltenen Addukte in Benzol standen diese zum chromatographischen Trennungsgang bereit.

VII. Zersetzung der Quecksilberaddukte

Zur Rückgewinnung der ungesättigten Fettsäuremethylester aus den Quecksilberaddukten wurden die einzelnen Elute des betreffenden chromatographischen Trennungsganges vom Lösungsmittel befreit, und die zurückgebliebenen Quecksilberadditionsverbindungen im 15-fachen Volumen Methanol gelöst. Die zur Spaltung benötigte Menge Ammoniumrhodanid und Salzsäure (pro Gramm Addukt sind 1 g NH_4SCN und 1 ml konz. Salzsäure erforderlich) wurden in der gleichen Menge Methanol gelöst, wobei Ausscheidung von Ammoniumchlorid erfolgte.

Die entstandene Suspension ließ man so schnell wie möglich unter Schwenken in die Lösung der Addukte einfließen. Nach einstündigem Stehen unter Stickstoff verdünnte man mit Wasser auf das Doppelte und extrahierte die regenerierten aus-
geschiedenen Fettsäureester mit Petroläther (Kp. 60 - 70 °C). Nach Waschen mit Wasser trocknete man über Natriumsulfat. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Die regenerierten Ester wurden abschließend zur Reinigung einer Vakuumdestillation im Zweikugelrohr unterworfen.

VIII. Oxydative Spaltung ungesättigter Fettsäureester nach dem Verfahren von E. v. RUDLOFF

Das Verfahren der oxydativen Spaltung nach v. RUDLOFF soll am Beispiel des Ölsäuremethylesters (s. Seite 54) im einzelnen beschrieben werden:

52 mg Ölsäuremethylester wurden in 25 ml wässrigem tert.-Butanol (der Wassergehalt betrug 10 %) gelöst und im Verlauf einer halben Stunde langsam in eine Oxydationslösung, bestehend aus 300 mg NaJO_4 , 5 mg KMnO_4 , 70 mg K_2CO_3 und 50 ml Wasser, eingetropft. Dabei nahm die Lösung eine violett-braune Farbe an. Nach dreistündiger Reaktionszeit erfolgte Reduktion durch Einleiten von gasförmigem SO_2 bis zum Auftreten eines gelbgrünen Farbtons. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von genügend Kaliumhydroxid alkalisch gemacht. Das zunächst ausfallende Mangandioxid-hydrat ließ man über Nacht absitzen, filtrierte am anderen Morgen von gebildetem Mangandioxid ab und dampfte das Filtrat fast vollständig ein. Die zurückgebliebenen Seifen wurden in Wasser aufgenommen und zur Entfernung von eventuell vorhandenem Unverseifbaren mehrfach mit Petroläther (Kp. 60 - 70 °C) geschüttelt. Anschließend wurde die Seifenlösung mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und die Spaltsäuren durch Schütteln mit 5mal 15 ml Äther extrahiert. Hierauf wusch man die ätherische Lösung mit destilliertem Wasser bis zur neutralen Reaktion, trocknete sodann über

Natriumsulfat und trieb das Lösungsmittel unter Zuhilfenahme einer kleinen Füllkörpersäule vollständig ab. Die zurückgebliebenen Spaltsäuren mußten zur gaschromatographischen Analyse abschließend in ihre Mono- bzw. Dimethylester überführt werden.

IX. Jodzahl

Unter der Jodzahl einer ungesättigten Verbindung versteht man die Menge Halogen, ausgedrückt in Gramm Jod, die von 100 g der Substanz chemisch gebunden werden. In der Praxis verfährt man meist so, daß man an Stelle von Jod, welches vielfach instabile Additionsprodukte liefert, besser Jodmonochlorid, Jodmonobromid oder, wie im vorliegenden Fall, Brom zur Anlagerung verwendet und die dem Bromverbrauch äquivalente Menge Jod dann errechnet. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Halbmikromethode nach H. P. KAUFMANN (42) benutzt, nach der mit sehr geringen Substanzeinwaagen (10 - 30 mg) verlässliche Werte erzielt werden können.

10 - 30 mg Fettsäuremethylester wurden auf einem Deckgläschen ausgewogen und mitsamt dem Glas in einen 50 ml Jodzahlkolben überführt. Als Lösungsmittel fügte man 2 ml Chloroform p. a. hinzu und ließ anschließend aus einer 5 ml Mikrobürette 2,0 ml einer mit Natriumbromid gesättigten Bromlösung zufließen, wobei eine Nachlaufzeit von 30 sec. genau einzuhalten war. Zur Herstellung der Bromlösung wurden 0,7 ml Brom in 25 ml Methanol gegeben, das mit Natriumbromid gesättigt war. Da die Reaktionszeit bei der Jodzahlbestimmung von der Anzahl der Doppelbindungen im Molekül abhängig ist (für Monoene sind etwa 10 min, für Tetraene dagegen schon 60 min erforderlich), ließ man genügend lange im Dunkeln stehen, setzte danach 3 ml einer 10%igen wässerigen Kaliumjodidlösung zu und titrierte das ausgeschiedene Jod mit n/20-Natriumthiosulfatlösung aus einer 5 ml Mikrobürette zurück. Als Indikator wurden jeweils

5 Tropfen einer 0,5%igen Stärkelösung verwendet. Anschließend führte man in gleicher Weise einen Blindversuch durch. Die gesuchte Jodzahl errechnete sich nach der Formel

$$JZ = \frac{(b - a) \cdot 0,6346}{c}$$

a = Verbrauch an n/20-Natriumthiosulfatlösung (ml)

b = Blindverbrauch (ml) und

c = Einwaage (g).

X. Katalytische Hydrierung

Zur Identifizierung (Bestimmung der Kettenlänge) isolierter ungesättigter Fettsäuremethylester bedient man sich unter anderem der Überführung in die zugehörige gesättigte Verbindung mit Hilfe der katalytischen Hydrierung.

Dazu wurden etwa 10 mg Substanz in 15 ml Eisessig gelöst und 5 - 10 mg Hydrierungskatalysator (PtO_2 nach ADAMS) zugefügt. Mit Hilfe eines Magnetrührers wurde die Suspension gut durchmischt und bei geringem Wasserstoffüberdruck innerhalb von 30 Minuten vollständig durchhydriert. Anschließend filtrierte man vom Katalysator ab und verdünnte das Filtrat mit Wasser auf das Dreifache seines Volumens. Die ausgeschiedenen, gesättigten Fettsäureester wurden durch mehrfaches Schütteln mit Äther extrahiert. Aus der über Natriumsulfat getrockneten, ätherischen Lösung ließen sich die gesättigten Ester durch Abdampfen des Lösungsmittels in reiner Form isolieren.

XI. Alkaliisomerisierung

Fettsäuren mit konjugierten Doppelbindungen im Molekül zeichnen sich durch extrem hohe spezifische Extinktionskoeffizienten im UV-Bereich aus. Solche hohen spezifischen Extinktionen erlauben den Nachweis der einzelnen Sättigungsgrade in ungesättigten Fettsäuren durch spektroskopische Untersuchung im ultravioletten Wellenbereich. Die meisten der natürlich vorkommenden Fette enthalten jedoch Fettsäuren mit isolierten Doppelbindungen, die aber nur äußerst schwach im UV absorbieren. Zur spektroskopischen Untersuchung solcher mehrfach-ungesättigten Fettsäuren bedient man sich deshalb der Methode der Isomerisierung mit Alkalihydroxid. Hierbei werden unter dem Einfluß stark basischer Katalysatoren die vorhandenen isolierten Doppelbindungen in konjugierte überführt.

Als Isomerisierungsgemisch wurde eine Lösung von Kaliumhydroxid in Äthylenglykol verwendet. Zu ihrer Herstellung wurden 24 g KOH in 100 ml frischdestilliertem Äthylenglykol unter Erwärmen gelöst. Im Äthylenglykol eventuell enthaltenes Wasser entfernte man durch allmähliches Erhitzen der Lösung auf 190 °C im Verlauf einer Stunde. Dabei empfahl es sich, einen langsamen Stickstoffstrom durch die Lösung zu leiten. Der Alkaligehalt der Lösung wurde titrimetrisch bestimmt und auf 21 Gew.-% an KOH eingestellt.

0,5 ml des Isomerisierungsgemisches wurden in einem dickwandigen Reagenzglas 15 Minuten lang auf genau 180 °C erhitzt. Durch Einleiten von Stickstoff konnten oxydative Veränderungen der Reaktionslösung verhindert werden. Anschließend warf man auf einer kleinen Glasscherbe eine genau abgemessene Menge der Probe (1 mg Fettsäuremethylester) in die Lösung. Man schüttelte kurz durch und hielt die Lösung mit der Probe noch genau 8 Minuten bei 180° C im Ölbad.

Danach wurde rasch abgekühlt und das Reaktionsgemisch mit Methanol p. a. quantitativ in einen 100 ml Meßkolben überführt. In gleicher Weise wurde ein Blindversuch durchgeführt. Anschließend erfolgte die Messung der Lösungen in Quarzküvetten bei 1 cm Schichtdicke im Spektralphotometer PMQ 2 der Firma Carl Zeiss bei Wellenlängen von 220 bis 400 nm.

XII. Herstellung der Trennsäulen für die gaschromatographische Analyse

Zur Herstellung von gepackten Trennsäulen wird nach den in der Literatur beschriebenen Verfahren die gewählte stationäre Phase in einem geeigneten, niedrig siedenden Lösungsmittel aufgelöst, und das feste Trägermaterial hierin suspendiert. Anschließend vertreibt man das Lösungsmittel entweder unter Rühren, oder besser, um den mechanischen Abrieb des Trägermaterials möglichst niedrig zu halten, am Rotationsverdampfer im Vakuum bei mäßig erhöhter Temperatur. Bei komplizierten Trennungen (um solche handelt es sich meist bei gaschromatographischen Analysen von Fettsäuregemischen nativen Ursprungs) reicht die Leistungsfähigkeit der auf diesem Wege hergestellten Säulen jedoch nicht mehr aus. Zur Erzielung höherer Trennstufenzahlen wurde deshalb ein Vorschlag von H. VOGT (34) geprüft, nach dem das Trägermaterial vor dem Imprägnieren mit stationärer Phase bei erhöhter Temperatur im Hochvakuum von anhaftenden Luftschichten und Feuchtigkeit weitgehend befreit wird. Dadurch sollte eine gleichmäßigere und bessere Benetzung des Trägermaterials möglich sein. Das Verfahren konnte mit Erfolg ausgearbeitet werden und soll im folgenden in allen Einzelheiten vorgestellt werden:

Das mit Hilfe einer Siebmaschine einheitlich klassierte Trägermaterial (es wurde ausschließlich Embacel, 60 - 100 mesh, Korngröße 0,160 - 0,200 mm, verwendet) wurde in einem 500 ml Zweihalskolben 5 Stunden lang im Ölbad bei 200 °C

und einem Druck von ca. 10^{-4} Torr evakuiert. Nach dem Erkalten wurde bei bestehendem Vakuum die in reinem, getrocknetem Chloroform gelöste stationäre Phase langsam durch einen Tropftrichter in den Kolben eingesogen. Nach einstündigem Stehen befreite man die jetzt breiige Masse zunächst bei Zimmertemperatur, später bei maximal 70°C am Rotationsverdampfer unter Wasserstrahlvakuum vom Lösungsmittel. Das nunmehr rieselfähige Material mußte abschließend zur Entfernung letzter Lösungsmittelsuren drei Tage bei 75°C im Vakuumtrockenschrank behandelt werden. Danach füllte man das trockene Pulver unter seitlichem Klopfen in die u-förmig gebogenen Kupferrohre ein. Die einzelnen Rohrteile wurden über Ermeto-Verschraubungen miteinander verbunden. Beide Enden der Trennsäule wurden mit Glaswollepfropfen verschlossen. Die gefüllte Trennsäule mußte schließlich unter Stickstoff bei langsamer Temperatursteigerung ausgeheizt werden. Die gesamte Ausheizzeit betrug drei Tage. Danach waren die Säulen betriebsbereit. Die nach diesem Verfahren hergestellten Polydiäthylenglykolsuccinatsäulen besaßen Trennstufenzahlen von etwa 1000 pro Meter Säulenlänge.

Für die verwendeten Trennsäulen wurden folgende Ansätze gewählt:

1. Polydiäthylenglykolsuccinatsäule (polare Trennsäule)

Zu 32 g Embacel gab man eine Lösung von 8 g Polydiäthylenglykolsuccinat in 120 ml Chloroform. Das entsprach einer Imprägnierung mit 20 % flüssiger Phase. Die Länge der benutzten Trennsäulen betrug 2,5 m, der innere Durchmesser des Cu-Rohres 4 mm.

2. Mineralölsäule

Zur Herstellung einer unpolaren Trennsäule löste man 4,5 g Mineralöl "Ondina" (Weißöl der Firma Deutsche Shell) und 90 mg Triäthanolamin (tailing-reducer) in 100 ml Chloroform. Als Trägermaterial wurden 25,5 g Embacel benötigt. Damit konnte eine 15%ige Imprägnierung des Trägers erzielt werden. Die Säulenlänge betrug wieder 2,5 m, der innere Durchmesser des Cu-Rohres 4 mm.

A N H A N G

Infrarot- und Ultraviolettpektren
der isolierten ungesättigten Fett-
säuremethylester

I. Allgemeines

Bei der Konstitutionsbestimmung der aus menschlichem Leberfett isolierten ungesättigten Fettsäuremethylester mußte stets auch auf die spektroskopischen Untersuchungen im infraroten und ultravioletten Wellenbereich zurückgegriffen werden.

Organische Verbindungen haben die Eigenschaft, in Abhängigkeit von ihrer Struktur Licht bestimmter Wellenlänge λ zu absorbieren. Aus den erhaltenen Absorptionsbanden lassen sich Rückschlüsse auf die Anwesenheit bestimmter Atomgruppierungen im Molekül ziehen. Bei der Absorption im Infraroten ($\lambda = 2 - 50 \mu\text{m}$) handelt es sich um Schwingungsübergänge innerhalb der Molekeln. Im ultravioletten und sichtbaren Bereich ($\lambda = 200-800 \text{ nm}$) beruht die Absorption dagegen auf Übergängen von Elektronen aus dem Grundzustand in höhere, angeregte Zustände.

II. Infrarotspektren

Die auf den folgenden Seiten abgebildeten IR-Spektren der isolierten ungesättigten Fettsäuremethylester wurden sämtlich mit dem Spektrophotometer Modell 221 der Firma Bodenseewerk Perkin-Elmer aufgenommen. Die Substanzen wurden dabei ohne Lösungsmittel in einer Schichtdicke von 15 - 20 μ zwischen Kochsalzplatten vermessen.

Die Untersuchungen im Infraroten wurden hauptsächlich zur Prüfung auf Anwesenheit trans-Isomerer durchgeführt. Ungesättigte Fettsäureester mit trans-Konfiguration zeigen nämlich im Infraroten bei 10,36 μ (965 cm^{-1}) eine charakteristische Absorptionsbande, die durch eine CH-Deformationsschwingung (out-of-plane-Schwingung) der Wasserstoffatome an den doppelt gebundenen C-Atomen verursacht wird.

Diese Absorptionsbande wird nur von trans-Verbindungen gegeben. Sie kann außer zum qualitativen Nachweis von trans-Isomeren auch zur quantitativen Bestimmung derselben in Gemischen zusammen mit all-cis-konfigurierten Verbindungen herangezogen werden. Bei der quantitativen Bestimmung des Gehaltes an trans-Isomeren ist jedoch zu beachten, daß all-cis-Verbindungen bei $10,36 \mu$ ebenfalls geringe Absorption zeigen, die wahrscheinlich von benachbarten Banden herrührt. Man muß bei der quantitativen Auswertung der Spektren deshalb zunächst die Extinktionsdifferenz $\Delta E = E_{\text{trans}} - E_{\text{cis}}$ zwischen den Spektren der reinen all-trans- und all-cis-Isomeren bestimmen. Für das Paar Öl-/Elaidinsäuremethylester wurde bei einer Schichtdicke von 15μ ein Wert von $\Delta E = 0,44$ bestimmt.

Die Berechnung des trans-Gehaltes erfolgte dann nach dem Ansatz:

$$\% \text{ trans} = \frac{100 \cdot (E_{\text{Substanz}} - E_{\text{cis}})}{\Delta E}$$

Zur Ermittlung des Differenzbetrages $E_{\text{Substanz}} - E_{\text{cis}}$ überbrückte man das Tal der trans-Bande zeichnerisch und ermittelte von diesem vorgegebenen Kurvenzug aus bei 965 cm^{-1} die obige Extinktionsdifferenz. Als ΔE wurde der ermittelte Wert von $0,44$ eingesetzt. Bei mehrfach-ungesättigten Fettsäuremethylestern sollen sich, den Angaben der Literatur (43) entsprechend, die Extinktionsbeträge der einzelnen Doppelbindungen näherungsweise addieren.

Aus den auf den folgenden Seiten abgebildeten IR-Spektren konnten für die einzelnen ungesättigten Fettsäureester folgende prozentuale Anteile an trans-Isomeren errechnet werden:

Gesamtfettsäuren	--- %
C ₁₄ -Monoen	4,6 %
C ₁₆ -Monoen	--- %
C ₁₈ -Monoen	3,4 %
C ₁₈ -Dien	19,5 %
C ₁₈ -Trien	23,0 %
C ₂₀ -Monoen	14,0 %
C ₂₀ -Dien	30,0 %
C ₂₀ -Trien	10,3 %
C ₂₀ -Tetraen	27,5 %
C ₂₂ -Hexaen	7,0 %

In den Gesamtfettsäuremethylestern waren trans-Isomere nicht feststellbar. Die für die verschiedenen isolierten Reinsubstanzen gefundenen Anteile an trans-Verbindungen sind, wie mehrfach erläutert, sehr wahrscheinlich durch den komplizierten Trennungsgang und die damit verbundene hohe thermische Belastung während der Destillation entstanden. Sie dürften als Artefakte anzusprechen sein. Die ungesättigten Fettsäuren des menschlichen Leberfettes besaßen ursprünglich sehr wahrscheinlich all-cis-Konfiguration.

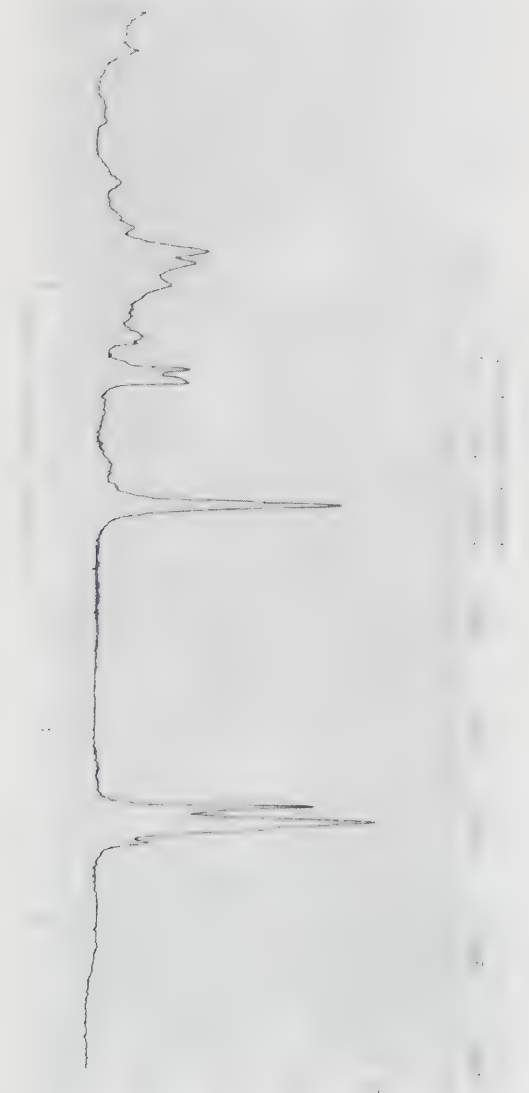


Abb. 25 IR-Spektrum der Gesamtfettsäuremethylester



Abb. 26 IR-Spektrum des Tetradeconsäuremethylesters

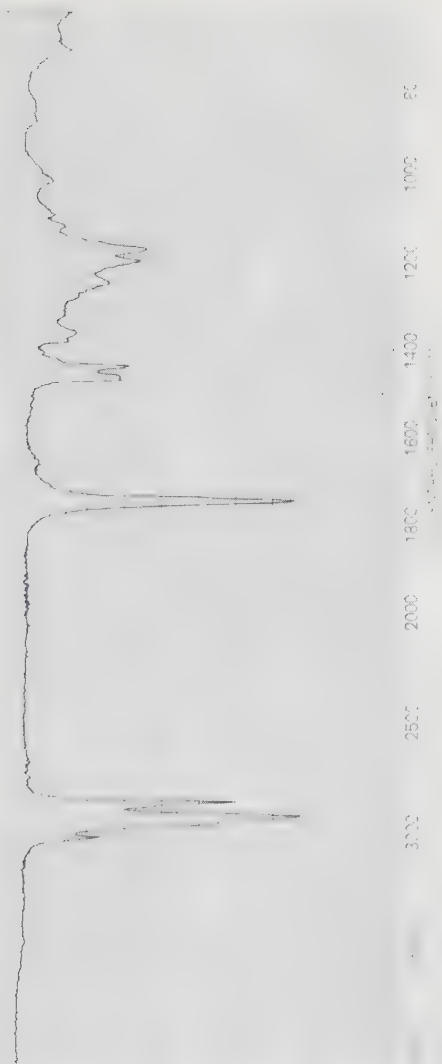


Abb. 27 IR-Spektrum des Hexadecensäuremethylesters

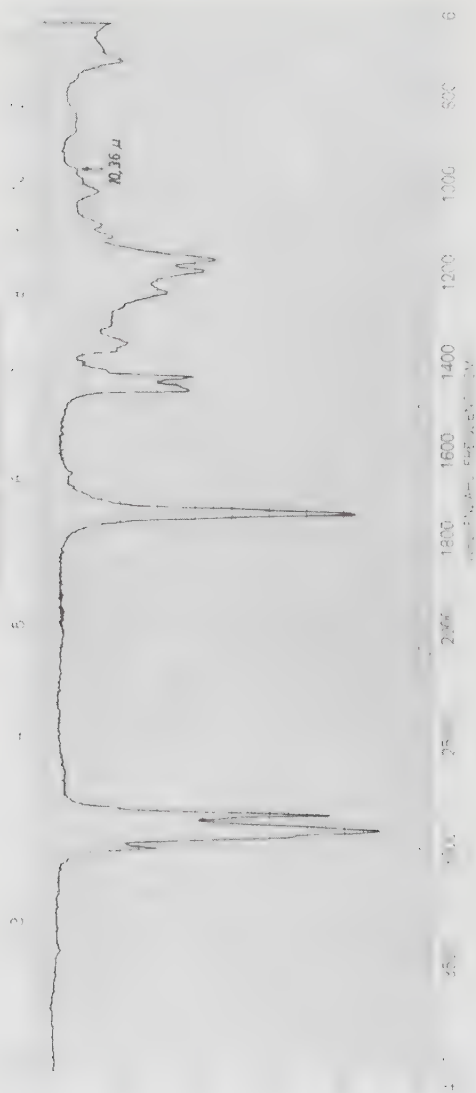


Abb. 28 IR-Spektrum des Oktadecensäuremethylesters

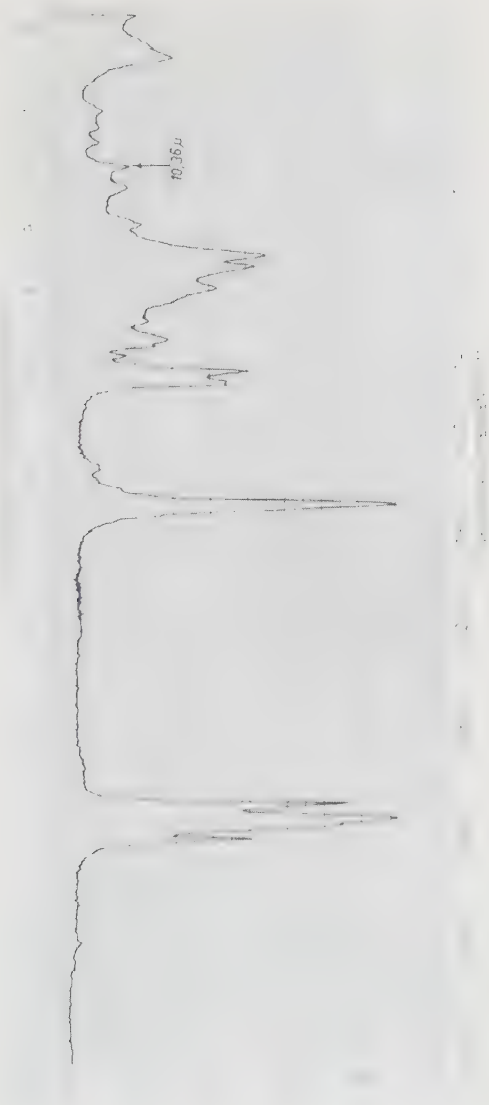


Abb. 29 IR-Spektrum des Oktadekadiensäuremethylesters

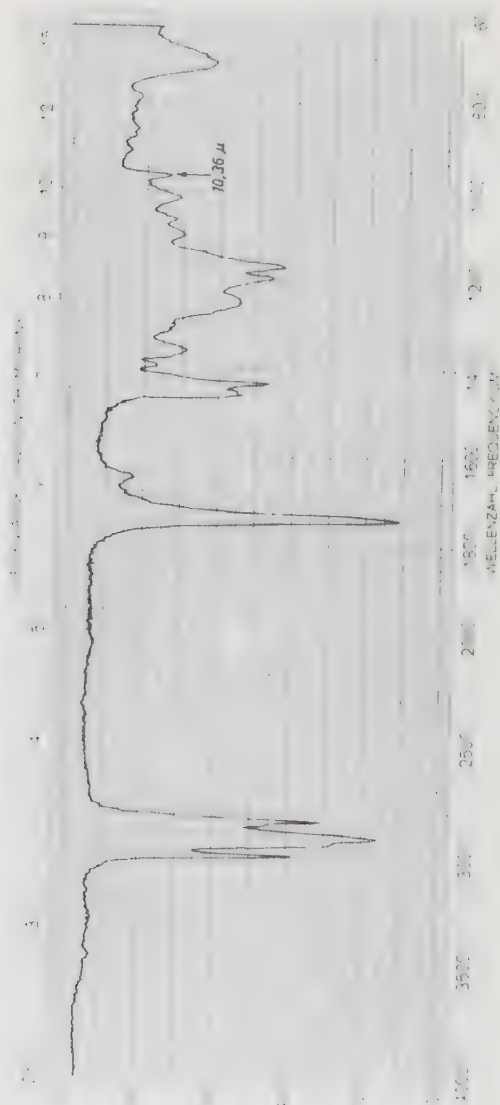


Abb. 30 IR-Spektrum des Oktadekatriensäuremethylesters

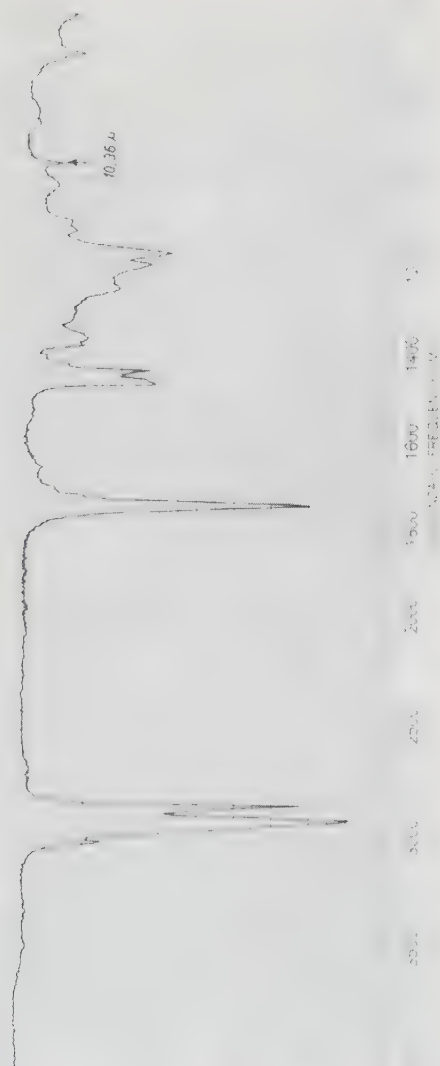


Abb. 31 IR-Spektrum des Eikosensäuremethylesters

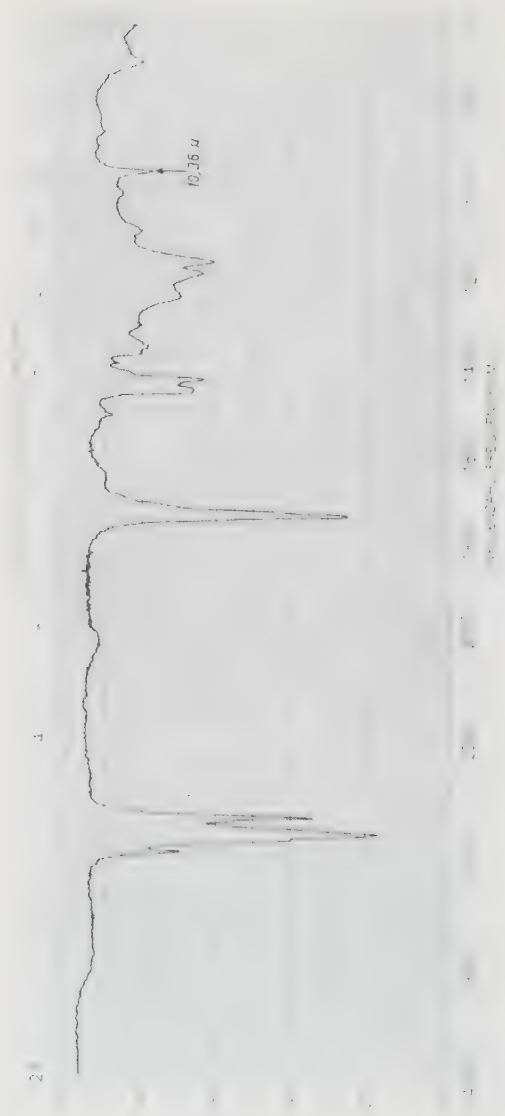


Abb. 32 IR-Spektrum des Eikosadiensäuremethylesters



Abb. 33 IR-Spektrum des Eikosatriensäuremethylesters

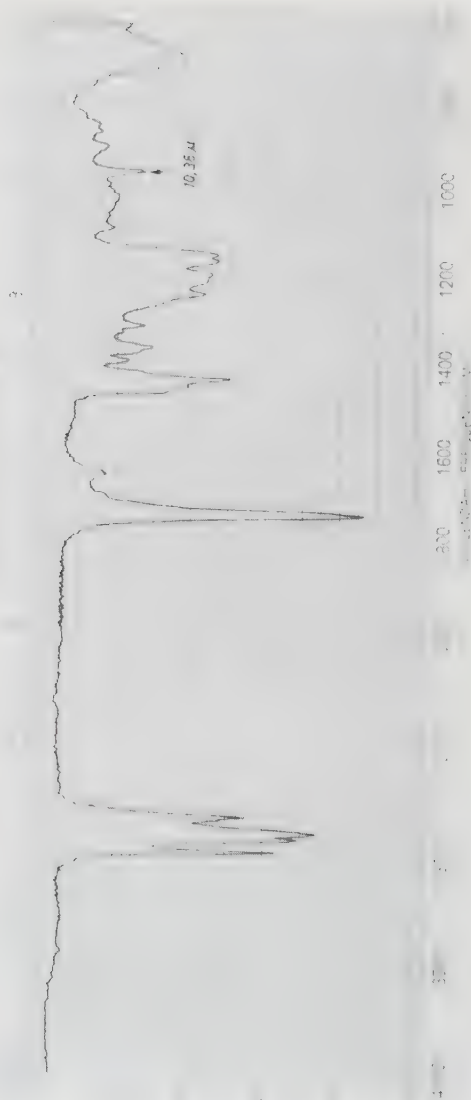


Abb. 34 IR-Spektrum des Eikosatetraensäuremethylesters

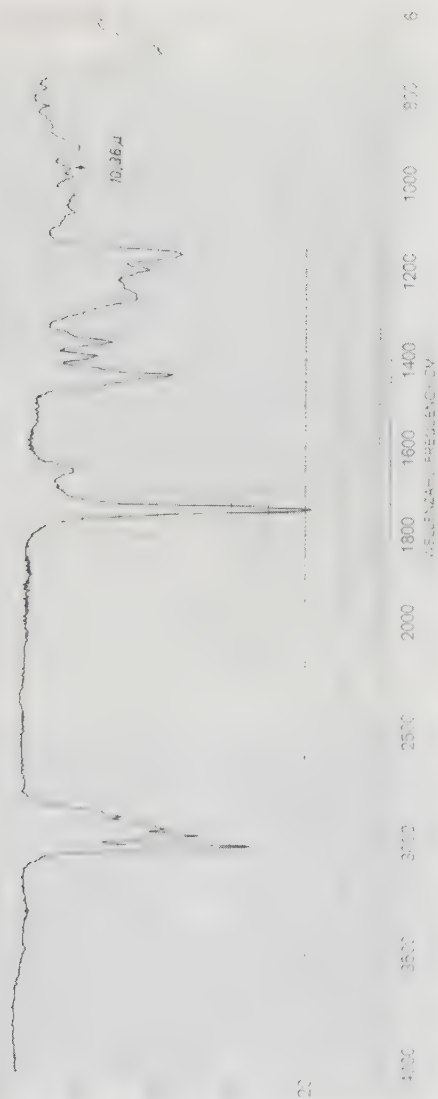


Abb. 35 IR-Spektrum des Dokosaheksäuremethylesters

III. Ultraviolettspektren

Die in den natürlich vorkommenden Fetten enthaltenen mehrfach-ungesättigten Fettsäuren sind im allgemeinen nach dem Divinylmethanrhythmus aufgebaut, d. h., sie enthalten zwischen zwei Doppelbindungen eine Methylengruppe. Fettsäuren mit isolierten Doppelbindungen lassen sich aber spektroskopisch im ultravioletten Wellenbereich nur mangelhaft erfassen. Säuren mit konjugierten Doppelbindungen hingegen zeichnen sich durch extrem hohe spezifische Absorptionskoeffizienten im UV aus. Man kann Verbindungen mit konjugierten Doppelbindungen deshalb noch in kleinsten Mengen UV-spektroskopisch nachweisen.

Die einzelnen Konjuene besitzen im Ultravioletten jeweils drei charakteristische Absorptionsmaxima:

Sie liegen für	all-cis-Diene	bei 224, 232 und 238 nm
	für all-cis-Triene	bei 258, 268 und 279 nm
	für all-cis-Tetraene	bei 288, 301 und 315 nm
	für all-cis-Pentaene	bei 315, 328 und 346 nm
und	für all-cis-Hexaene	bei 333, 352 und 374 nm.

Das mittlere Absorptionsmaximum besitzt jeweils den höchsten Wert. Zur Aufnahme der UV-Spektren wurden die mehrfach-ungesättigten Fettsäureester durch Alkaliisomerisierung (s. i. experimentellen Teil) in die zugehörigen Konjuene überführt und deren Extinktionswerte im Spektralphotometer bei Wellenlängen zwischen 200 und 400 nm bestimmt. Wegen der hohen Absorptionskoeffizienten mußte in großer Verdünnung gearbeitet werden. Die Konzentrationen der Lösungen lagen bei 0,01 g/l. Als Lösungsmittel verwendete man Methanol p. a.



Abbildung 37

UV-Spektrum von Oktadekatriensäure-methylester vor (a) und nach (b) der Alkaliisomerisierung



Abbildung 36

UV-Spektrum von Oktadekadiensäure-methylester vor (a) und nach (b) der Alkaliisomerisierung

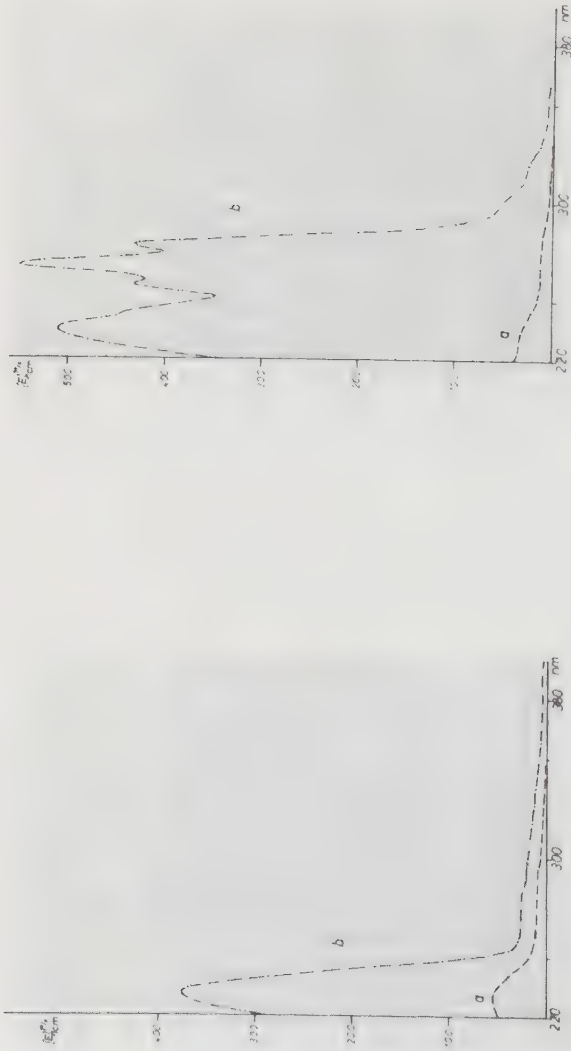


Abbildung 38

UV-Spektrum von Eikosadiensäuremethylester vor (a) und nach (b) der Alkalisomerisierung

Abbildung 39

UV-Spektrum von Eikosatriensäuremethylester vor (a) und nach (b) der Alkalisomerisierung



Abbildung 40

UV-Spektrum von Eikosatetraensäure-methylester vor (a) und nach (b) der Alkalisomerisierung

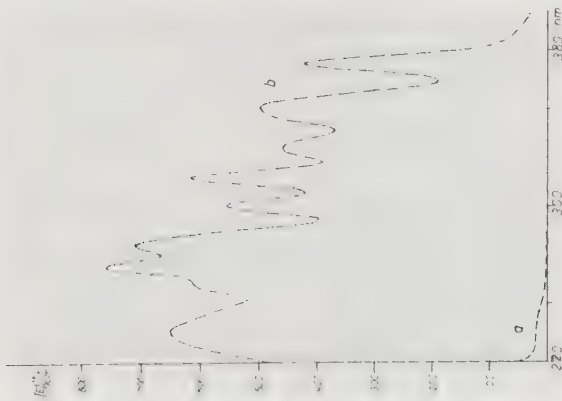


Abbildung 41

UV-Spektrum von Dokosaheensäure-methylester vor (a) und nach (b) der Alkalisomerisierung

Hatte man gleichzeitig auch das UV-Absorptionsspektrum der nicht isomerisierten Probe mitgemessen (Kurvenzug a der UV-Spektren), so ließen sich die dabei ermittelten Extinktionswerte zur Abschätzung des Konjuengehaltes in den chemisch unveränderten Estern verwenden.

Zur Berechnung des Konjuengehaltes diene der Ansatz:

$$\% \text{ Konjuen} = \frac{E \cdot V \cdot 100}{k \cdot m},$$

$$E = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{100}{D} \quad (D = \text{Durchlässigkeit in } \%)$$

V = Volumen der Lösung (ml)

m = Einwaage (mg) und

k = spezifischer Extinktionskoeffizient (1/g · cm).

Die spezifischen Extinktionskoeffizienten entstammten der Literatur (61, 62):

$$k \text{ [1/g} \cdot \text{cm]}$$

Dien	(bei $\lambda = 232 \text{ m}\mu$)	119
Trien	(bei $\lambda = 268 \text{ m}\mu$)	192
Tetraen	(bei $\lambda = 301 \text{ m}\mu$)	320

Die Konzentration der Lösungen der nicht isomerisierten Ester wurde zu 0,1 g/l gewählt. Nach der oben angegebenen Formel enthielten die isolierten, nicht isomerisierten Fettsäureester folgende Anteile an Dien-, Trien- und Tetraen-Konjuen:

C ₁₄ -Monoen	Dien-Konjuen	0,8 %
	Trien-Konjuen	0,2 %
C ₁₆ -Monoen	Dien-Konjuen	0,4 %
	Trien-Konjuen	0,06%
C ₁₈ -Monoen	Dien-Konjuen	0,3 %
	Trien-Konjuen	0,06%

C ₁₈ -Dien	Dien-Konjuen	0,6	%
	Trien-Konjuen	0,2	%
C ₁₈ -Trien	Dien-Konjuen	1,7	%
	Trien-Konjuen	0,5	%
C ₂₀ -Monoen	Dien-Konjuen	0,9	%
	Trien-Konjuen	0,3	%
C ₂₀ -Dien	Dien-Konjuen	4,5	%
	Trien-Konjuen	0,6	%
C ₂₀ -Trien	Dien-Konjuen	2,8	%
	Trien-Konjuen	0,7	%
C ₂₀ -Tetraen	Dien-Konjuen	4,2	%
	Trien-Konjuen	1,4	%
C ₂₂ -Hexaen	Dien-Konjuen	1,7	%
	Trien-Konjuen	0,2	%
Gesamtfettsäuren	Dien-Konjuen	0,6	%
	Trien-Konjuen	0,05	%
	Tetraen-Konjuen	0,03	%.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde das Fettsäuremuster der menschlichen Fettleber geklärt.

In den letzten 20 Jahren beschäftigte sich eine große Zahl biochemischer Arbeiten mit dem Thema des Stoffwechsels der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. In fast all diesen Untersuchungen wurden die Ergebnisse durch Versuche am tierischen oder pflanzlichen Material gewonnen. Wenn sich die tierische und pflanzliche Zelle auch aus vielerlei Gründen bevorzugt für solche Experimente anbot, so bestand doch letztlich der Wunsch, analoge Studien auch auf das entsprechende menschliche Organ zu übertragen. So wurde die menschliche Leber, die als zentrales Stoffwechselorgan auch für die Verwertung der Fette zuständig ist, zum Gegenstand dieser Untersuchung gewählt.

Mit Hilfe moderner Trennverfahren (Hochvakuumdestillation, Chromatographie mit Hilfe von Quecksilberaddukten, Gaschromatographie) konnte die Zusammensetzung des menschlichen Leberfettes weitgehend geklärt werden. Insgesamt wurden 48 verschiedene Fettsäuren durch chemische Analyse im Leberfett identifiziert. Von diesen 48 Säuren konnten 17 isoliert und in Form hochreiner Präparate vorgelegt werden. Dazu gehörte die vollständige Reihe der normalen, gesättigten geradzahligen Säuren von C_{12} bis C_{24} und die der Monoene von C_{14} bis C_{20} . An Polyensäuren wurden die Diene mit 18 und 20 Kohlenstoffatomen gewonnen. Niedere Sättigungsgrade konnten für die Kettenlänge C_{18} (Trien), C_{20} (Trien und Tetraen) und C_{22} (Pentaen und Hexaen) gefaßt werden. Neben diesen Säuren wurden zahlreiche Stellungsisomere der isolierten ungesättigten Vertreter nachgewiesen. Fast alle der aus

menschlichem Leberfett gewonnenen ungesättigten Säuren konnten als vielteilige Gemische Stellungsisomere erkannt werden. Ausnahmen bildeten nur C_{20} -Tetraen, C_{22} -Pentaen und C_{22} -Hexaen. Diese waren Reinsubstanzen und als Endprodukte der sich abspielenden Kettenverlängerungen und Dehydrierungen anzusehen.

Bei den isolierten ungesättigten Säuren handelte es sich um Verbindungen, die ursprünglich in der all-cis-Konfiguration vorgelegen haben dürften.

Die Mehrzahl der identifizierten ungesättigten Säuren ließ sich der KLENKschen Systematik der Polyenfettsäuren einordnen und gehörte danach zum Palmitolein-, Öl-, Linol- oder Linolensäuretyp. Diese Systematik konnte durch den Myristoleinsäuretyp $\angle \Delta (\omega - 5) \angle$ ergänzt werden. Nur einige der isolierten Säuren konnten keiner dieser Reihen eingeordnet werden. Für diese Vertreter wurde unter anderem die Zufuhr mit der Nahrung in Form pflanzlicher Öle diskutiert. Von der Pflanze werden bekanntlich besondere Wege beim Aufbau ungesättigter Fettsäuren beschritten.

Für die Biosynthese gesättigter und ungesättigter Fettsäuren in der tierischen Zelle gelten heute folgende Schritte als bewiesen:

1. a) Aufbau gesättigter Säuren de novo über den Acetatpool mit Hilfe von Acetyl-CoA als Startsubstanz unter Kettenverlängerung durch Malonyl-CoA um jeweils 2 Kohlenstoffeinheiten.
b) Kettenverlängerung bereits vorhandener Säuren mit Hilfe von Malonyl-CoA.
2. Einführung einer Doppelbindung in diese gesättigten Säuren, wobei die Dehydrierung bevorzugt zwischen dem 9. und 10. Kohlenstoffatom stattfindet.

3. Der Aufbau der Polyenfettsäuren erfolgt ausschließlich aus Linol- und Linolensäure. Diese beiden Säuren sind für die tierische und menschliche Zelle essentiell. Aus Linol- und Linolensäure entstehen alle anderen Polyenfettsäuren durch Kettenverlängerung und Dehydrierung, wobei neue Doppelbindungen nur in Richtung auf die Carboxylgruppe eingeführt werden können. Übergänge zwischen den verschiedenen Fettsäuretypen, sowie Hydrierungen bereits vorhandener Doppelbindungen, wurden bisher nicht beobachtet. Ein p a r t i e l l e r Abbau und Wiederaufbau ungesättigter Fettsäuren findet praktisch nicht statt.

Nur wenige der 48 identifizierten Fettsäuren waren Hauptkomponenten. Die meisten waren nur in geringer Menge oder gar in Spuren anwesend. Alle jedoch waren für das Verständnis der Stoffwechselwege der Fettsäuren wichtig. Nur so, durch die Kenntnis einer Vielzahl von Individuen, konnten in sich geschlossene Reihen aufgestellt werden, die biogenetische Zusammenhänge zwischen den einzelnen Gliedern erkennen ließen, und die unsere Vorstellungen vom Aufbau und Abbau der Fettsäuren im Organismus weiter vervollständigen.

Beweise für die Richtigkeit der skizzierten Vorstellungen vom Stoffwechsel der Fettsäuren in der menschlichen Fettleber stehen noch aus. Man war auf Vergleiche mit den Ergebnissen des Tierversuchs angewiesen. Anders als beim Tierexperiment sind hier am menschlichen Organ die Stoffwechselwege der Fettsäuren mit Hilfe radioaktiv markierter Verbindungen nur schwer zu studieren.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) M. E. Chevreul Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale, Levrault, Paris (1823)
- 2) Haller und C.r. hebd. Sceance Aced. Sci. 143,
Youssoufian 657 - 661; 803 - 806 (1906)
- 3) S. H. Bertram Recueil Trav. chim. Pays-Bas. 46,
397 (1927)
- 4) E. Jantzen und Chem.-Ing.-Techn. 26, 392
O. Wieckhorst (1954)
- 5) F. Lynen und Angew. Chem. 73, 513
M. Tada (1961)
- 6) E. Klenk Untersuchungen über die Chemie und
den Stoffwechsel der Polyenfett-
säuren, W. De Gruyter u. Co., Berlin
(1967)
- 7) W. Stoffel Die Naturwissenschaften 53,
621 - 630 (1966)
- 8) J.F. Mead, J.biol.Chem. 205, 683 (1953)
G. Steinberg und
D. R. Howton
- 9) V. Mc Mahon und Biochim. biophysica Acta (Amsterdam)
P.K. Stumpf 84, 359 (1964)
- 10) D.K. Bloomfield J.biol.Chem. 235, 337 (1960)
und K. Bloch
- 11) B. Kuchenbuch Diplomarbeit, Hamburg (1959)
- 12) E. Jantzen und Fette, Seifen 46, 563 (1939)
H. Witgert
- 13) G. List Diplomarbeit, Hamburg (1952)
- 14) S.W.S. Mc Creadie J.appl.Chem. 7, 47 (1957)
und
A.F. Williams
- 15) E.H. Dubsky und J.Chromatography 4, 1 (1960)
J. Janak

- 16) K.A. Hofmann Ber. dtsch. chem. Ges.
und J. Sand 33, 1340 u. 2692 (1900)
 34, 1385 u. 2906 (1901)
 35, 3170 (1902)
 36, 3699 (1903)
- 17) J. Sand Liebigs Ann. Chem. 329, 135 (1903)
- 18) K.A. Hofmann Ber. dtsch. chem. Ges.
und 39, 3187 (1906)
E. Seiler
- 19) F. Cotton und J. Am. chem. Soc. 80, 4823 (1958)
J. Leto
- 20) W. Manchot Ber. dtsch. chem. Ges. 53B,
 984 (1920)
- 21) W. Manchot und Liebigs Ann. Chem. 420, 170 (1920)
A. Klüg
- 22) E. Jantzen und Chem. Ber. 94, 628 (1961)
H. Andreas
- 23) B. Kuchenbuch Dissertation, Hamburg (1963)
- 24) K. Morgenstern Dissertation, Hamburg (1961)
- 25) R. Hofmann Dissertation, Hamburg (1963)
- 26) - Unveröffentlichte persönliche
 Mitteilung, Hamburg (1964)
- 27) F. Bandte Dissertation, Hamburg (1959)
- 28) B. Jäger Diplomarbeit, Hamburg (1961)
- 29) - Dissertation, Hamburg (1963)
- 30) R. Hofmann Diplomarbeit, Hamburg (1961)
- 31) E. v. Rudloff Can. J. Chem. 33, 1714 (1955)
- 32) - Can. J. Chem. 34, 1413 (1956)
- 33) E. Klenk und Z. physiol. Chem. 290, 181 (1952)
W. Bongard
- 34) U. Troll Diplomarbeit, Hamburg (1964)
- 35) E. Klenk Experientia (Basel) 17, 199 (1961)
- 36) R.A. Landowne Biochim. biophys. Acta 46, 1 - 6
und (1961)
S.R. Lipsky

- 57) W. Stoffel, Z. physiol. Chem. 339, 167 (1964)
 R. Ditzer und
 H. Caesar
- 58) W. Stoffel und Z. physiol. Chem. 341, 76 (1965)
 H. Caesar
- 59) W. Stoffel und Z. physiol. Chem. 341, 84 (1965)
 H.-G. Schiefer
- 60) H. Oertel Dissertation, Hamburg (1961)
- 61) H.P. Kaufmann, Fette, Seifen, Anstrichmittel
 J. Baltes, 52, 210 (1950)
 F. Volbert und
 K. Brockhausen
- 62) DGF-Einheits- Abteilung C - Fette C-IV 6 (57)
 methoden

L E B E N S L A U F

Ulrich T r o l l

Geboren am 6. Oktober 1934 als Sohn des Studienrates Max Troll und seiner Ehefrau Ilse, geb. Eggers.

Nach dem Besuch der Volksschulen in Hamburg und Binz auf Rügen von 1940 bis 1946 trat ich 1946 in die Bismarckoberrealschule in Hamburg ein, an der ich 1954 das Abitur bestand.

Vom Sommersemester 1954 bis zum Sommersemester 1955 einschließlich belegte ich Mineralogie an der Universität Hamburg.

Im Wintersemester 1955/56 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität Hamburg, wo ich im Juli 1959 die Diplomchemiker-Vorprüfung und im November 1962 die Diplomchemiker-Hauptprüfung ablegte. Von Dezember 1962 bis Juli 1964 arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ernst Jantzen am Institut für Technische Chemie der Universität Hamburg an meiner Diplomarbeit, die das Thema "Die qualitative und quantitative Identifizierung der Fettsäuremethylester aus dem Gaschromatogramm" trug.

Im Oktober 1964 trat ich als Diplomchemiker in die Medizinische Klinik der Universität Erlangen-Nürnberg ein. Laut Beschluß der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg vom 23. 2. 1966 wurde mir die Erlaubnis zur Anfertigung einer naturwissenschaftlichen Dissertation erteilt. Die vorliegende Arbeit wurde neben meiner hauptamtlichen Tätigkeit an der Klinik durchgeführt.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990